

CZU: 616:616-022.6

## FACTORII DE VIRULENȚĂ A FUNGILOR PATOGENI: SEMNIFICAȚIA CLINICĂ ȘI DETECTAREA FENOTIPICĂ

*Olga BURDUNIUC*

*Agenția Națională pentru Sănătate Publică  
Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”*

Articolul reprezintă revista literaturii în baza analizei surselor literare, selectate printr-o cercetare în bazele de date Web of Science, PubMed/MedLine, EMBASE, Scopus, HINARI, care conțin cele mai recente și relevante informații. Au fost revizuite studiile privind factorii de virulență a fungilor și metodologiile de detectare. În lucrare sunt prezentate datele cercetărilor privind următorii factori de patogenitate: mecanismele de adeziune, sinteza enzimelor hidrolitice, responsabile de leziunile țesuturilor gazdă, efectele imunomodulatoare, deteriorarea eficacității rezistenței antimicrobiene a gazdei, mecanismele de formare a biofilmelor. Sunt listate și metodologiile de cercetare *in vitro* a acestor factori. Capacitatea unor fungi de a provoca boli este condiționată de factorii de virulență, care ajută la supraviețuirea fungilor și la persistența lor în gazdă, ducând la afectarea țesutului și la boală. Detectarea factorilor de virulență și persistența acestora permite medicilor microbiologi și clinicieni să facă distincția dintre colonizare și infecție fungică.

*Cuvinte-cheie: fungi, factori de virulență, persistență, patogenitate.*

### VIRULENT FACTORS OF PATHOLOGIC FUNGI: CLINICAL MEANING AND PHENOTYPICAL DETECTION

The article represents the review based on the analysis of literary sources, selected through documentary research into Web of Science, PubMed/MedLine, EMBASE, Scopus, and HINARI databases containing the most recent and relevant information. Studies concerning the fungi virulent factors and the methods of their detection. In the paper, data on the following pathogenicity factors are presented: adhesion mechanisms, synthesis of hydrolytic enzymes responsible for host tissue lesions, immunomodulatory effects, deterioration of the antimicrobial resistance of the host, mechanisms of biofilm formation are presented. The *in vitro* research methodologies of these factors are listed. The ability of fungi to cause disease is due to virulence factors that help the survival of fungi and persistence in the host, resulting in tissue damage and disease. Detection of virulence and persistence factors allows microbiologists and clinicians to distinguish between colonization and fungal infection.

*Keywords: fungi, factors of virulence, persistence, pathogenicity.*

### Introducere

Cercetările științifice studiate prezintă dovezi că pe pământ există aproximativ 1,5 milioane de specii de fungi, dar numai 600 sunt patogene pentru om, dintre care 30 sunt implicate în maladii umane. Afecțiunile fungice sunt în general cunoscute sub numele de *micoze*. Capacitatea fungilor de a provoca boli și factorii de virulență a acestora sunt un rezultat al strategiilor de depășire și supraviețuire în mediul dur al gazdei [1,2].

Autorii studiilor de bază propun a defini fungiile ca eucariote, care se răspândesc prin producerea de spori, și menționează că majoritatea acestora se pot reproduce atât sexuat, cât și asexuat, fiind răspândiți pretutindeni în mediul înconjurător. Există trei încrengături majore de fungi, la care aparțin majoritatea fungilor patogeni umani. Acestea sunt *Ascomycota*, *Basidiomycota* și *Zygomycota* [3].

Infecțiile fungice sunt tot mai frecvent răspândite, asociate cu o creștere a mortalității și a morbidității. Majoritatea infecțiilor fungice sunt superficiale și relativ ușor de tratat. Totuși, există și milioane de infecții fungice invazive ce pot pune în pericol viața, mai cu seamă a persoanelor cu imunodeficiență, cancer și transplant. Aceste infecții sunt favorizate de utilizarea irațională a antimicrobienelelor cu spectru larg, a corticosteroizilor și a terapiei imunosupresoare [4-7].

Actualmente, un șir de cercetări științifice au fost orientate spre studierea factorilor de virulență a fungilor. Studiind factorii de virulență și mecanismele de patogenitate se va putea identifica noi ținte pentru acțiunea antifungică [8,9].

Studiul realizat a pus accent pe analiza articolelor ce au abordat preponderent determinarea factorilor de virulență a genului *Candida*, deoarece este genul cel mai frecvent implicat în etiologia și dezvoltarea micozelor umane, dar în același timp au fost analizați și cei specifici altor fungi [10].

La moment, în toata lumea sunt raportări oficiale, studii și alte lucrări care elucidează cauzele, factorii de virulență și relevanța lor clinică în apariția și manifestarea clinică a acestora, estimează incidența și prezintă impactul social și economic al infecțiilor micotice [11].

Autorii unor studii comprehensive privind infecțiile micotice menționează că infecțiile cauzate de levuri din genul *Candida* sunt unele dintre cele mai răspândite infecții micotice la om și la animale, de la cele superficiale la cele diseminate. Ele se găsesc în general la persoane cu un sistem imunitar slăbit sau chiar compromis, la un contingent foarte larg, precum copiii și nou-născuții, la bolnavii diabetici, la persoanele care au făcut terapie cu antibiotice timp îndelungat [12,13].

Conform datelor unor autori, colonizarea reprezintă capacitatea fungilor patogeni de a supraviețui și de a se multiplica în organismele gazdă sensibile, totodată reprezentând etapele esențiale ale procesului infecțios [14].

### Material și metode

Au fost analizate ca surse reviste și website-uri medicale și au fost selectate cele mai recente și relevante articole la subiectul abordat, cu revizuirea și sistematizarea informațiilor publicate în ultimii 10 ani. Studiul s-a bazat pe analiza a 65 de surse bibliografice privind factorii de virulență a fungilor și metodologiile de detectare.

### Rezultate și discuții

În această lucrare sunt prezentate datele studiilor privind cercetarea factorilor de virulență a fungilor, precum: capacitatea de a adera la țesuturile gazdei; sinteza enzimelor hidrolitice care provoacă leziuni tisulare și interferență directă cu sistemul de apărare a gazdei; dimorfismul – capacitatea de existență în două forme și trecerea de la o formă la alta, termotoleranța la cel puțin 37°C contribuie la diseminarea infecției; efectele imunomodulatoare; deteriorarea eficacității rezistenței antimicrobiene a gazdei; mecanismele de formare a biofilmelor [8,15,16].

Studiile cu referire la noțiuni și definiții privind subiectul abordat relatează următoarele [17].

*Patogenitatea* (gr. *pathos* – boală, suferință; gr. *geneia*, fr. *génie* – născut, produs al) este proprietatea esențială a oricărui agent patogen de fungi și constă în capacitatea acestuia de a genera un proces infecțios, același din punct de vedere clinic, manifestat prin starea de boală, atunci când pătrunde în organismul sensibil pe cale naturală sau pe cale experimentală. Un microorganism patogen este capabil să inducă leziuni tisulare la o gazdă receptivă. În mod obișnuit, patogenitatea este asociată, inexact, cu modul de viață parazitara a microorganismelor, dar calitatea de patogen nu se asociază totdeauna cu parazitismul. Patogenitatea a apărut în cursul co-evoluției gazdă-parazit și implică existența a patru proprietăți esențiale: pătrunderea și localizarea în țesuturile gazdei; multiplicarea și producerea de toxine/invadarea gazdei; inducerea unui răspuns imun și rezistența la mecanismele de apărare a gazdei; producerea leziunilor specifice [18].

*Virulența* (lb. latină *virulentus* – otrăvitor) este capacitatea relativă a unei tulpini patogene de a determina leziuni tisulare (de a coloniza, de a se multiplica și, eventual, de a invada celulele și țesuturile gazdei și/sau de a produce toxine), determinând o stare patologică la o gazdă receptivă. Virulența exprimă *cantitativ* gradul de patogenitate a unei tulpini pentru o anumită gazdă și este o proprietate multifactorială, dependentă de particularitățile structurale și fiziologice ale agentului patogen, materializate în: infecțiozitate (capacitatea de colonizare), agresivitate (invazivitate), toxigenitate [18].

*Infecția* (lb. latină *inficere* – otrăvi) este determinată de capacitatea agentului patogen de a pătrunde, de a se localiza și multiplica în organismul-gazdă sensibil [19].

*Factori de virulență* sunt niște structuri fungice ale unor proteine membranare sau cu unele particularități fiziologice și de sinteză (sinteza exotoxinelor sau a exoenzimelor), care determină producerea unor leziuni în organismul gazdei [20].

*Adezinele*. Studiile realizate în ultimul deceniu subliniază semnificația și capabilitatea fungilor patogeni de a provoca boli printr-un arsenal de factori de virulență [10].

Cercetările în domeniu au stabilit că primii factori de virulență implicați în invazivitatea fungului prin colonizarea gazdei sunt structurile specializate de pe suprafața fungilor numite proteinele de adeziune. Prima etapă a colonizării unui țesut este aderența fungilor la celulele gazdei, în cazul de față, în mod special la epiteliu și endoteliu. Aderența asigură colonizarea anumitor situsuri din organism, multiplicarea fungilor, sinteza toxinelor și desfășurarea reacției inflamatorii de apărare [21,22].

Studiile în domeniu denotă că aderența împiedică îndepărtarea fungilor prin fluxul secrețiilor, tuse, motilitatea cililor. Structurile fungice de aderență, anatomice sau moleculare, sunt de cele mai multe ori adaptative. Ele

dispar prin cultivarea succesivă *in vitro* condiționată de complementaritatea sarcinilor electrice ale celor două suprafețe. Aderența reprezintă un avantaj ecologic major pentru fungii patogeni, cu privire la asigurarea nutrienților, protecția față de anticorpi și lizozim etc. Multiplicarea lor, după aderență, are loc cu o rată net superioară față de cea a celulelor neaderente [23].

Autorii altor studii afirmă că factorii de adeziune nespecifici la etapa inițială permit fungilor să se atașeze și să supraviețuiască pe suprafața epiteliului; astfel, fibrile glicoproteice cu centru hidrofobic al peretelui celular nu asigură doar adeziunea la țesuturile gazdei, dar și la multe materiale plastice, utilizate în catetere, sisteme de transfuzie și endoproteze. Adeziunea specifică este determinată de receptorii de adeziune [24,25].

Cercetările în domeniu denotă că capacitatea de aderare a reprezentanților diferitelor specii de *Candida* variază considerabil, fiind mai accentuată la *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida dubliniensis* și mai scăzută la speciile *Candida glabrata* și *Candida krusei* [26].

Autorii studiilor comprehensive în acest domeniu menționează accentuarea proprietăților adezive ale fungilor la acțiunea asupra organismului uman a antibioticelor, hormonilor glucocorticoizi, citostaticelor, precum și a condițiilor de cultivare și a vârstei culturii [24].

Sursele analizate atribuie rolul moleculelor de adeziune ale *Candidaei albicans* capacității de a se atașa de dispozitivele medicale, formând biofilmul ce sporește patogenitatea acestuia [10]. Aceste moleculele de adeziune includ proteinele Als, Hwp1p, Eap1p, Cshlp și altele [27,28].

Conform datelor unui șir de cercetări, s-a stabilit că există opt gene care codifică proteinele Als. Aceste proteine mediază adeziunea la colagen, celule endoteliale, celule epiteliale și agregare celulă-celulă, Hwp1p mediază legarea la epiteliu, în timp ce Intlp mediază aderența la trombocite [29]. Cercetarea suprimării Als3 este esențială în dezvoltarea unui vaccin pentru prevenirea candidozei invazive [30].

Studii relevante evidențiază printre fungii patogeni ce posedă adeziune *Aspergillus fumigatus*, *Histoplasma capsulatum* și *Paracoccidioides brasiliensis*. Conidiile de *Aspergillus fumigatus* sunt acoperite cu proteine hidrofobe cunoscute sub denumirea de bastonașe. Aceste proteine sunt codificate de către genele RODA și RODB și mediază aderarea conidiei la albumină și colagen. Receptorii de pe suprafața hifelor includ galactomannanul și chitina din *Aspergillus fumigatus*, care mediază aderența la complement, fibrinogen, imunoglobulină și surfactantul A și D [31].

Un grup de cercetători aduc dovezi că *Blastomyces dermatitidis* aderă prin BAD1, care leagă CR3 și CD14 de fagocite și modulează, de asemenea, răspunsurile imune ale gazdei [32]. Alți cercetători descriu că *Histoplasma capsulatum* folosește pentru adeziune HSP60 [33], în timp ce *Paracoccidioides brasiliensis* folosește 3-fosfat dehidrogenaza (GAPDH) și polipeptidele p19, p30, p32 [34], iar *Coccidioides immitis* utilizează peretele exterior sferic (sferule) (SOW) pentru a adera la celula gazdă [35].

Există alte studii analizate pe un șir de proteine fungice, numite analogi de integrine. Acestea prezintă similarități structurale cu receptorii pentru complement CR3 și CR4, ceea ce facilitează adeziunea la celulele epiteliale. Partea proteică prezentată de o glicoproteină de suprafață a fungului aderă la structurile epiteliului (fibronectine, colagen, laminine etc.) [36,37].

Cercetările ținute oferă exemplu de interacțiune proteină-proteină ce servește interacțiunea demonstrată *in vitro* a proteinei candidozice Gpm1 (*Phosphoglycerate mutase* 1), care ajută fungul să se atașeze la celule endoteliale, keratinocite și monocite prin intermediul vibronectinei, proteină care aparține gazdei [38].

*Dimorfismul*. Acest factor de virulență este un alt subiect abordat de cercetători și reprezintă una dintre modalitățile prin care fungii patogeni pot deveni virulenți. Majoritatea fungilor patogeni prezintă dimorfism, adică pot trece de la o formă, care nu este patogenă, la o formă patogenă. În mediu poate exista ca un tip morfologic, precum microflora comensală, însă atunci când provoacă infecție, există ca alt tip morfologic. Prin urmare, fungii dimorfici reprezintă o categorie aparte de microorganisme, care pot apărea sub două forme, în funcție de condițiile de mediu. Autorii dau exemplu de fungi dimorfici, precum *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Paracoccidioides brasiliensis* și *Candida albicans*. Ele pot exista în formă de levuri sau filamentoasă. Fungii în formă de levuri se găsesc în țesuturile organismelor parazitare sau la 37°C *in vitro*, iar forma filamentoasă apare când sunt cultivate la temperatura camerei sau la 30°C, pe medii uzuale. Unii fungi pot avea alte tipuri morfologice, de exemplu *Coccidioides immitis* poate forma sferule mari prin endosporulare. Formele intermediare, cum ar fi pseudohife, pot exista, așa cum se observă, la *Candida albicans* [39-42].

*Termotoleranța* este un factor de patogenitate aparte descris de autorii unor studii cu referință la factorii de virulență. Acest factor de virulență se manifestă prin abilitatea de a crește la temperatură ridicată. Fungii, care

cauzează infecții sistemice, pot să crească la temperatura corpului și chiar și la temperaturi febrile de 38-42°C. *Aspergillus fumigatus* este evident termofil și poate să crească la temperaturi de până la 55-77°C [8]. Studiile în domeniu au demonstrat că HSP70 (proteine de șoc termic) sunt prezente la unii fungi, inclusiv la *Aspergillus fumigatus*, și este necesar pentru ca să se adapteze la temperaturi ridicate [43].

Studiile științifice accentuează că fungii patogeni se schimbă de la o formă la alta în cazul devierilor de temperatură; majoritatea din ei există în formă filamentoasă la temperatura mediului ambiant și devin levuri la temperatura mamiferului. Atunci când tranziția de la forma filamentoasă la cea levuriformă este blocată, precum în cazul *Histoplasma capsulatum*, microorganismul continuă să crească la 37°C, dar în acest caz este prezentă formă avirulentă [44].

Autorii relatează ambele forme patogene pentru *Candida spp.* Ea își modifică forma ca răspuns la modificările din mediul existent (temperatură scăzută, pH acid și altele), ca levură unicelulară, ulterior răspândindu-se în mediu și ca formă hifală destinată invaziei tisulare [27].

*Capsula* este listată de majoritatea studiilor la factorii de patogenitate cu implicare semnificativă în dezvoltarea unor micoze. Cercetările analizate accentuează că forma capsulată a fungilor este de obicei prezentă la fungii patogeni. *Cryptococcus neoformans* se acoperă cu o capsulă glucoronoximannan (GXM), cu care rezistă fagocitoza. Capsula de tip polizaharidic este de obicei proeminentă în izolatele care cauzează infecții, în timp ce *Cryptococcus neoformans* din mediul înconjurător este slab încapsulat. Tulpinile lipsite de capsulă nu sunt virulente, deoarece sunt ușor fagocitate. Genele responsabile pentru încapsulare sunt CAP59 și CAP64. Capsula epuizează, de asemenea, complementul și provoacă o dereglare a rețelei de citokine. Capsula inhibă, de asemenea, mobilizarea leucocitelor în locul infecției [45-49].

*Capacitatea fungilor de a produce enzime* a fost cea mai cercetată din șirul factorilor de virulență. S-a constatat că fungii patogeni produc enzime degradante, care le permit să stabilească boala și să disemineze. Aceste enzime provoacă leziuni ale țesutului gazdei și afectează imunitatea gazdei. Pentru a invada, fungii penetrează epiteliul/endoteliul cu ajutorul enzimelor hidrolitice, așa ca: aspartil proteaze (codificate de genele SAP), fosfolipaze și lipaze. *Candida spp.* secretă fosfolipaze extracelulare, lipaze și proteaze. *Candida* patogenă secretă mult mai multă fosfolipază decât tulpinile comensale, iar fosfolipazele A, B, C și D acționează prin ruperea legăturilor de ester. Aceste enzime sunt, de asemenea, importante pentru nutriție și absorbția fierului [8,50].

*Candida spp.* secretă, de asemenea, SAP (aspartat-proteaza), care hidrolizează proteinele matrixului extracelular, factori de coagulare, cum ar fi factorul Hageman și factorul X, proteinele de apărare a gazdei, de ex. mucin, IgA, lactoferină și complemente [51].

*Aspergillus fumigatus* secretă proteaze (serină și aspartat-protează, metaloprotează) și fosfolipaze, care degradează elastina prezentă în țesutul pulmonar. Proteazele serine degradează colagenul, fibrina și fibrinogenul [8].

În ceea ce privește activitatea proteazelor asupra epiteliului, studiile subliniază acțiunea de stimulare, colonizare și apoi de penetrare a membranelor mucoasei, pielei de către fungi. Este descris efectul de cavitație, în care se formează o cavitate în jurul celulei fungice adiacentă epidermului datorită acțiunii proteazelor [52,53]. În opinia altor autori, distrugerea mucinei de către proteaze asigură adeziunea celulelor *Candida spp.* la epiteliul intestinal, iar activitatea proteazelor împotriva proteinelor endoteliale vasculare duce la penetrarea în patul vascular și la declanșarea candidozei diseminate. Proteazele din componența celulei fungice asigură nu doar colonizarea cu agenți patogeni a țesuturilor gazdă, dar și protecția acestora împotriva factorilor imunologici. Efectul enzimelor proteolitice este orientat spre consolidarea capacității de adeziune și de penetrare a fungilor în raport cu diverse țesuturi și substraturi ale organismului [50].

Cercetările complexe denotă că eterogenitatea stabilită a enzimei pe contul izoformelor existente a arătat că producția enzimei este reglată de cel puțin 10 gene și activarea sau inhibarea unuia sau a mai multor izoforme duce la o scădere/creștere a virulenței atât a aceleiași, cât și a altor tulpini, aparținând unei singure specii de fungi. Rolul dovedit al proteazelor în realizarea proprietăților patogene de către fungii din genul *Candida*, activitatea proteolitică determinată *in vitro* nu se corelează întotdeauna cu virulența lor [54].

Alte studii menționează rolul *Cryptococcus neoformans* în invadarea sistemului nervos central prin producerea ureazei. Cercetările recente în acest domeniu au demonstrat că producția de urează este, de asemenea, utilizată de *Coccidioides immitis*, crescând alcalinitatea în locurile de infecție și tulpinile cu deficit de urează nu se pot disemina [55].

Unii autori au prezentat date bazate pe dovezi, în care menționează cazeinaza ca enzimă proteolitică ce hidrolizează cazeina, principala proteină din lapte [56].

Referindu-ne la un șir de cercetări privind *lipazele și β-hemolizinele*, studiile analizate au demonstrat rolul acestor enzime ca toxine formatoare de pori ce pot contribui la simptomele severe ale infecției. Acestea acționează asupra membranei celulei fungice, determinând pori la nivelul acesteia, mecanism prin care are loc diseminarea infecției în organismul uman [52,53,57].

Studii similare s-au efectuat pentru a stabili acțiunea *esculinazei* sau a *β-D-glucozidazei*, care hidrolizează esculina până la esculetin și glucoză. Esculetinul se remarcă prin legarea ionilor de fier și astfel se formează un complex cu implicații însemnate atât în creșterea fungilor, cât și în virulența acestora. Fierul este un compus esențial creșterii și virulenței microorganismelor. În mediul extracelular fierul se află într-o formă care nu poate fi asimilată de către celula fungică, pentru absorbția acestuia fiind necesari sideroforii (precum transferina). S-a dovedit că agenții chelatori ai fierului pot fi fixați de esculetol, așa că esculinaza are un rol important în asimilarea Fe necesar activării unor gene bacteriene și exprimării unor factori de virulență [58].

Majoritatea cercetărilor au demonstrat că DN-zele asigură reducerea viscozității secrețiilor în care se acumulează ADN din celulele lizate, permițând diseminarea bacteriilor și asigurându-le totodată mononucleotide pentru propriile sinteze. Metodologiile de detectare a producerii acestor enzime la tulpinile de funghi dovedesc potențialul de virulență al acestora [59].

Studiile analizate subliniază că neutrofilele și macrofagii utilizează mecanisme oxidative (ROS și RNS) pentru a distruge funghi prin peroxidarea lipidelor și prin distrugerea acidului nucleic. La rândul lor, funghi patogeni produc enzime cu care pot fi protejate de efectele oxidării. Acestea produc catalaze pentru protecție împotriva speciilor reactive la oxigen (ROS) [60].

Alte studii au demonstrat că *Candida spp.* utilizează superoxid dismutaza (SOD) și HSP (proteine de șoc termic) pentru a se proteja împotriva (ROS) [61], în timp ce *Cryptococcus neoformans* utilizează producerea de cupru, zinc și peroxidază pentru a rezista la oxidare [62]. *Aspergillus fumigatus* produce trei catalaze: Cat - A asociat cu conidia, Cat1p și Cat2p asociate cu hifele [31], precum și superoxid dismutazele (conținând Mn, Cu și Zn), care îl protejează de deteriorarea oxidativă [63].

Cercetările în acest domeniu au identificat melanina ca o substanță produsă de un șir de funghi patogeni, fiind hidrofobă; ea protejează împotriva unor condiții nefavorabile, cum ar fi radiațiile UV și temperaturi ridicate, de asemenea protejează împotriva ROS [31].

În *Cryptococcus neoformans* s-a demonstrat că melanina evită deteriorarea antimicotică și inhibă fagocitoza mediată de anticorpi [64]. Melanina este, de asemenea, sintetizată de *Aspergillus fumigatus* de la acetat, utilizând o cale cu ajutorul a șase gene [31]; *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces* și *Paracoccidioides brasiliensis* sunt alte ciuperci patogene, care produc melanină [65].

Autorii unui studiu complex au categorisit capacitatea fungilor de a obține Fe ca o necesitate pentru procesul de creștere, respirație și alte procese metabolice, dar, în același timp, acesta nu este disponibil în formă liberă în gazdă. Prin urmare, capacitatea de a obține Fe din formele de depozitare sau de transport în gazdă este un factor de virulență. Studiile au demonstrat că *Aspergillus fumigatus* folosește trei mecanisme de absorbție a Fe: absorbția de Fe reductază, absorbția de Fe mediată de siderofor și mecanismele de absorbție a Fe feros [66].

Studiile realizate au identificat la *Aspergillus nidulans* doi siderofori: triacetil fusanina C (TAFC) și desferri-ferricrocina [67].

Alte cercetări au adus dovezi, prin care au demonstrat că *Candida spp.* obține fier prin diferite mecanisme, precum utilizarea sideroforilor și absorbția directă de la hem în celulele roșii din sânge, folosind receptorii de hemoglobină (familia RBT5) pe suprafața lor celulară [68]. *Candida spp.* utilizează, de asemenea, un mecanism reductiv, care utilizează reductazele Cfl1/Fre și Cfl95/Fre10/Rbt2 [69].

Alt factor de patogenitate studiat de cercetători sunt toxinele. Autorii menționează că *Aspergillus fumigatus* secretă așa toxine, cum ar fi aflatoxina și gliotoxina. Aflatoxina nu are nicio influență asupra virulenței *Aspergillus fumigatus*, în schimb este hepatotoxică și carcinogenă. Gliotoxina este imunosupresoare, inhibă fagocitoza de către macrofage și activarea celulelor T [70].

Alți cercetători afirmă că toxinele de asemenea încetinesc mișcarea ciliară, ceea ce face dificilă îndepărtarea celulelor fungice și provoacă deteriorarea epiteliului. Majoritatea altor funghi produc un număr de metaboliți secundari, care au numeroase acțiuni celulare, unele din ele sunt, probabil, importante în patogeneza infecțiilor micotice [71].

Studii realizate în domeniul dat accentuează rolul calcineurinei și al manitolului în patogenia infecțiilor fungice. Calcineurina acționează ca un senzor pentru fungii patogeni. Se consideră că influențează expresia câtorva factori de virulență. Gena calcineurin (CNA) este importantă pentru creșterea *Aspergillus fumigatus* și contribuie ulterior la invazia tisulară [27,72].

Alți autori vin cu argumente că manitolul este utilizat în special de *Cryptococcus neoformans* în infecțiile sistemului nervos central, unde protejează fungii prin prevenirea leziunilor oxidative. Este produs în cantități mari și poate contribui la dezvoltarea edemului cerebral [73].

**Formarea biofilmelor.** Într-un număr considerabil de surse analizate este studiat procesul de formare a biofilmelor. Aceste studii au demonstrat că formarea biofilmelor are un rol important în patogenitatea fungilor. Biofilmul este caracterizat ca un agregat de microorganisme atașate ireversibil la un substrat care comunică și aderă între ele și la o suprafață biologică/non-biologică. Microorganismele produc o matrice extracelulară polimerică (un amestec de proteine, polizaharide, ADN extracelular, detritusuri celulare) de care se înconjoară și care oferă rezistență. Aderența la un substrat reprezintă o etapă inițială a formării biofilmului microbial [10].

Capacitatea fungilor, în special din genul *Candida*, de a forma biofilme este semnificativă din punct de vedere clinic, deoarece această proprietate este o cauză probabilă a candidemiei persistente ca rezultat al rezistenței crescute la agenții antifungici tradiționali [74].

În ce privește metodologia de detectare a factorilor de virulență, autorii susțin că studierea *in vitro* a factorilor asociați peretelui celular (capacitatea de a filamenta, de a adera la celulele epiteliale și la substratul inert), capacitatea de a secreta enzime solubile (proteaze, lipaze, fosfolipaze și DN-aze), capacitatea de a lega  $Fe^{3+}$  pot fi evaluate prin metode fenotipice [75].

**Determinarea capacității de formare a hifelor.** Cercetările privind metodologiile de studiere a formării hifelor denotă că inducerea formării acestora poate fi efectuată cu utilizarea mediului RPMI lichid, suplimentat cu ser fetal bovin de 10% (vol/vol) (FBS). Mediul RPMI se va inocula cu celule din culturile de 16-18 ore pentru a se obține o densitate de pornire de  $5 \times 10^6$  celule/ml și se va incuba la 37°C timp de 3 ore. Tuburile de germeni sau formarea hifelor fiecărei tulpini se va evalua microscopic. Procentul de forme hifale se va determina prin determinarea numărului de celule de creștere și hipal / pseudohipal, pe zece câmpuri microscopice randomizate [76,77].

**Determinarea factorilor de adeziune.** În alte studii a fost analizată metodologia de detectare a factorilor de adeziune la celulele HeLa. Conform acestei metodologii, celulele trebuie crescute până la confluență de 80% în vase cu culturi celulare de 75 cm<sup>2</sup>, utilizând mediul Eagle modificat de Dulbecco, suplimentat cu ser fetal bovin de 10% la 37°C, într-o atmosferă cu 5% CO<sub>2</sub> și umiditate. Ulterior, la 80% confluență celulele vor fi tripsinizate și însămânțate pe plăci cu 6 godeuri de poliviniliden-difluorură (PVDF) ( $10^5$  celule/godeu) și vor fi crescute până la confluență de 70%. Cultura proaspătă a tulpinilor de fungi patogeni crescute în mediu lichid YPG timp de 18 ore la 37°C va fi supusă centrifugării timp de 5 minute la 6000 rpm și paleta trebuie resuspendată în soluție salină izotonică tamponată de fosfați (pH 7,2) la o densitate de 0,5 McFarland. Vor fi folosiți 300 μl de tulpini microbiene pentru a infecta celulele HeLa. După incubare la 37°C, 5% CO<sub>2</sub> timp de 2 ore, plăcile vor fi spălate de 3 ori cu soluție salină izotonică tamponată de fosfați (pH 7,2), apoi fixate cu metanol 95% la temperatura camerei. Urmează etapa de uscarea a plăcilor la temperatura camerei și colorarea după Giemsa. Capacitatea de aderență a fungului poate fi detectată microscopic prin numărarea celulelor de fungi atașate la celulele eucariote în zece câmpuri microscopice randomizate per godeu. Fiecare determinare trebuie efectuată de trei ori [78].

**Determinarea dezvoltării biofilmului pe substratul inert.** Testarea formării biofilmului poate fi realizată în microplăci de polistiren cu 96 de godeuri conform metodei puțin modificate propuse de Y.Jin și colaboratorii. Inițial tulpinile de fungi trebuie crescute la 37°C timp de 18 ore în agar de dextroză Sabouraud (SDA). Cultura de fungi obținută după 10 minute este supusă centrifugării la 6500 rpm și spălării de două ori cu salină izotonică tamponată de fosfați, cu resuspendarea în bază de azot de drojdie (YNB) suplimentată cu glucoză 50 mM. Ulterior, în fiecare godeu se vor adăuga 200 μl de suspensie celulară de 18 ore ( $10^5$  celule/ml) în YNB, care vor fi incubate timp de 72 de ore la 37°C fără agitare. După incubare, godeurile vor fi spălate ușor de 4 ori cu PBS pentru a îndepărta celulele neaderente și fixate cu metanol timp de 5 minute. Se va îndepărta metanolul și în fiecare godeu se vor adăuga 200 μl de violet cristal (2mg/ml), urmând incubarea timp de încă 15 minute la temperatura camerei. După colorare urmează etapa de spălare de 4 ori, cu salină izotonică tamponată de fosfați, pentru a îndepărta colorantul în exces și se va descrește cu 220 μl de 33% acid acetic. Formarea biofilmului este evaluată prin măsurarea absorbanței la 490 nm, utilizând un cititor de plăci de microtitrare [16].

Un șir de studii au realizat cercetări în scopul elaborării metodologiei de detectare a enzimelor de virulență a fungilor. Conform celor mai relevante dintre aceste studii, evidențierea fenotipică a expresiei factorilor enzimatici solubili implicați în virulență poate fi efectuată prin însămânțarea tulpinilor de fungi pe un șir pe medii de cultură cu diferite substraturi, pentru exprimarea anumitor enzime: hemolizine (mediu cu geloza sânge), amilaza (mediu cu amidon), cazeinaza (mediu cu lapte), gelatinaza (mediu cu gelatină), producerea de esculinază, DN-ază (mediu cu ADN), lipază (mediu cu tween) și molecule siderofor (mediu cu esculină), fosfolipazele (mediu cu lecitină) [75].

*Determinarea aspartil proteazei.* Conform metodologiei propuse de Mohan Vinitha, aspartil proteaza poate fi determinată folosind mediu de albumină serică bovină (dextroză 2%, KH<sub>2</sub>P04 0,1%, MgSO<sub>4</sub> 0,05%, agar 2%, amestecat după răcire la 50°C cu fracțiunea V de albumină serică de 0,5%). Autorii recomandă determinarea activității proteazei prin spotarea a 10 μl de suspensie microbiană de 16-18 ore (10<sup>8</sup> celule/ml), resuspendată în PBS pe suprafața mediului. Următoarea etapă este cea de incubare a plăcilor, care se realizează la 37°C timp de 7 zile. După incubare, plăcile necesită fixare cu 20% acid tricloracetic, colorate cu 1,25% amidoblack și destinate cu acid acetic 15%. Zona clară, corespunzătoare proteolizei în jurul petelor care nu pot fi colorate cu amidoblack, indică degradarea proteinei [79].

*Determinarea activității fosfolipazei extracelulare* poate fi realizată după mai multe metodologii. Dar majoritatea studiilor recomandă tehnica ce necesită aplicarea, de 16-18 ore, la suprafața mediului cu gălbenuș de ou a 10 μl de suspensie microbiană (10<sup>8</sup> celule/ml), resuspendată în PBS. Mediul de gălbenuș de ou a constat din 13 g/L agar de dextroză Sabouraud furnizat cu 11,7 g/l NaCl, 0,111 g/l CaCl<sub>2</sub> și 10% gălbenuș steril de ou. Gălbenușul de ou necesită a fi adăugat în mediu după sterilizare; când media a atins 50°C, plăcile trebuie incubate la 37°C timp de 48 de ore. Zona de precipitare din jurul coloniei corespunde producției de fosfolipază (PLz) și urmează a fi calculată așa cum s-a menționat mai sus pentru metoda de producere a aspartil proteazei [80].

*Determinarea activității lipazelor* poate fi realizată după metodologia lui W.Rudek, care a propus o tehnică prin utilizarea Tween 80 ca substrat pentru detectare. Astfel, agarul Sabouraud a fost suplimentat cu 1% Tween 80, care a fost adăugat după autoclavare la 121°C timp de 15 minute, când mediul a atins 50°C. Ulterior, 10 μl de suspensie de microorganisme de 16-18 ore (10<sup>8</sup> celule/ml), resuspendate în PBS, au fost repicate pe suprafața mediului. Plăcile au fost incubate la 37°C timp de 48 de ore. Detectarea activității lipolitice (Lz) a fost efectuată prin observarea zonelor de precipitare în jurul punctului de cultură. Precipitatul este reprezentat de sărurile de calciu insolubile, formate ca urmare a reacției chimice a ionilor de calciu cu acizii grași eliberați prin hidroliza Tween 80. Producția de liază (Lz) a fost calculată așa cum s-a menționat în metoda de obținere a aspartil proteazei [81].

*Determinarea activității hemolitice.* Studiile analizate privind metodologiile de detectare a activității hemolitice recomandă utilizarea mediului agar Sabouraud suplimentat după sterilizare, când mediul a atins 45°C, cu sânge de ovine defibrinat de 5%. 10 μl de suspensie microbiană de 16-18 ore (10<sup>8</sup> celule/ml) trebuie resuspendate în PBS și repicate pe suprafața mediului. Ulterior, plăcile vor fi incubate la 37°C timp de 24 de ore. Prezența zonei distincte translucide în jurul coloniei indică o activitate hemolitică pozitivă (Hz). Analiza trebuie efectuată în triplicat pe trei experimente separate pentru fiecare tulpină izolată și calculată conform metodelor prezentate mai sus [79].

*Determinarea producerii deoxiribonucleazei extracelulare (DN-azei).* Autorii cercetărilor analizate pentru detectarea activității DN-azei indică ca mediu de testare agarul pentru deionizare (Difco), suplimentat cu soluție de toluen toluidină 0,01% (v/v). 10 μl de suspensie microbiană de 16-18 ore (10<sup>8</sup> celule/ml), resuspendate în PBS, vor fi repicate pe mediu și plăcile vor fi incubate timp de 48 de ore la 37°C. Test pozitiv se consideră producerea de zone roz în mediu albastru de toluidină [59].

*Determinarea producerii de siderofor.* Publicațiile analizate în această lucrare recomandă utilizarea mediului agar de esculină pe bază de bile (BEA) pentru identificarea capacității unor tulpini de a produce compuși implicați în chelarea fierului, rezultată din hidroliza esculinei. Agenții de chelare a fierului (esculetin) pot fi detectați prin punerea a 10 μl de suspensie microbiană de 16-18 ore (10<sup>8</sup> celule/ml), resuspendată în PBS, pe suprafața mediului BEA. Plăcile vor fi apoi incubate la 37°C timp de 24 ore. Reacția pozitivă poate fi observată după pigmentarea neagră a mediului în jurul spotului de cultură prin interacțiunea dintre esculetinul cu sarea de citrat feric de fier, adăugată la mediul de cultură. Cantitatea de producție asemănătoare sideroforului (Iz) poate fi determinată raportând diametrul total la diametrul spotului de cultură [66].

### Concluzii

1. Infecțiile fungice fac parte din grupul bolilor infecțioase emergente și au pondere din ce în ce mai mare în cadrul maladiilor infecțioase, mai ales în contextul abuzului de antimicrobiene, corticosteroizi și preparate imunosupresoare.
2. Capacitatea unor specii de fungi de a provoca boli este condiționată de factorii de virulență, care ajută la supraviețuirea acestora și la persistența lor în organismul gazdă, determinând afectarea țesuturilor cu dezvoltarea micozelor superficiale sau generalizarea procesului, soldate cu infecții fungice invazive.
3. Virulența fungilor este atribuită nu doar unui singur factor, ci unei combinații a mai multor factori, cum ar fi: fosfolipazele, lipazele, hemolizinele, aspartil proteazele, DN-azele, acumularea de fier, adezinele, biofilmul și dimorfismul morfologic, rezistența la preparatele antimicotice.
4. Gravitatea infecțiilor micotice este determinată de echilibrul dintre patogenitatea microorganismului și capacitatea de apărare a gazdei și apar mai frecvent în cazul afectării sistemului imun.
5. Concentrarea atenției cercetătorilor pe studii comprehensive ale factorilor de virulență și ale mecanismelor de rezistență la antifungice are ca beneficiu elaborarea vaccinurilor eficiente contra micozelor, noi antifungice, stabilirea protocolului de utilizare clinică a acestora.
6. Studiarea factorilor de virulență a fungilor are și o importanță clinică majoră în evaluarea corectă a biosubstratelor cu rezultat pozitiv pentru fungi și inițierea ulterioară a terapiei adecvate.

### Referințe:

1. HAWKSWORTH, D.L. The magnitude of fungal diversity: The 1.5 million species estimate revisited. In: *Mycol. Res.*, 2001, no105, p.1422-1432.
2. BLACKWELL, M. The fungi: 1, 2, 3... 5.1 million species? In: *Am. J. Bot.*, 2011, no98, p.426-438.
3. IYALLA, C. A review of the virulence factors of pathogenic fungi. In: *African Journal of Clinical and Experimental Microbiology*, 2017, vol.18, no1, p.53-58.
4. BROWN, G.D., DENNING, D.W., GOW, N.A.R., LEVITZ, S.M., NETEA, M.G., WHITE, T.C. Hidden killers: Human fungal infections. In: *Sci. Transl. Med.*, 2012, no4, p.165rv13.
5. VOS, T., FLAXMAN, A.D., NAGHAVI, M., LOZANO, R., MICHAUD, C., EZZATI, M., SHIBUYA, K., SALOMON, J.A., ABDALLA, S., ABOYANS, V. et al. *Years lived with disability (YLDs) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990–2010: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010*. *Lancet Lond. Engl.* 2012, no380, p.2163-2196.
6. TAYLOR, L.H., LATHAM, S.M., WOOLHOUSE, M.E. Risk factors for human disease emergence. In: *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 2001, no356, p.983-998.
7. HAVLICKOVA, B., CZAIKA, V.A., FRIEDRICH, M. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. In: *Mycoses*, 2008, no4, p.2-15.
8. HOGAN, L.H., KLEIN, B.S., and LEVITZ, S.M. Virulence factors of medically important fungi. In: *Clin. Microbiol. Rev.*, 1996, no9(4), p.469-488.
9. KARKOWSKA-KULETA, J., RAPALA-KOZIK, M., KOZIK, A. Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. In: *Acta Biochim. Pol.*, 2009, no56(2), p.211-224.
10. CHANDRA, J., KUHN, D.M., MUKHERJEE, P.K., HOYER, L.L., McCORMICK, T., GHANNOUM, M.A. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. In: *J. Bacteriol.*, 2001, no183(18), p.5385-5394.
11. BRUNKE, S., MOGAVER, S., KASPER, L., HUBE, B. Virulence factors in fungal pathogens of man. In: *Current Opinion in Microbiology* vol., 2016, no32, p.89-95.
12. STANISZEWSKA, M., BONDARYK, M., PIŁAT, J., SIENNICKA, K., MAGDA, U., KURZATKOWSKI, W. Virulence factors of *Candida albicans*. In: *Przegl. Epidemiol.*, 2012, no 66(4), p.629-633.
13. ANTONIO, D., ROMANI, F., PONTIERI, E., FIORITONI, G., CARACCILO, C., BIANCHINI, S. et al. Catheter-related candidaemia caused by *Candida lipolytica* in a patient receiving allogeneic bone marrow transplantation. In: *J. Clin. Microbiol.*, 2002, no40(4), p.1381-1386.
14. MARKOWSKI, J., HELBIG, G., WIDZISZOWSKA, A., LIKUS, W., KYRCZ-KRZEMIEŃ, S., JAROSZ, U., DZIUBDZIELA, W., MARKIEWICZ, M. Fungal colonization of the respiratory tract in allogeneic and autologous hematopoietic stem cell transplant recipients: a study of 573 transplanted patients. In: *Med. Sci. Monit.*, 2015 Apr 24, no21, p.1173-1180.
15. MANE, A., KULKARNI, A., RISBUD, A. Biofilm production in oral *Candida* isolates from HIV-positive individuals from Pune, India. In: *Mycoses.*, 2013, no56(2), p.182-186.



16. YIGIT, N., AKTAS, E., DAGISTAN, S., AYYILDIZ, A. Investigating biofilm production, coagulase and haemolytic activity in *Candida* species isolated from denture stomatitis patients. In: *Eur. J. Med.*, 2011, no43(1), p.27-32.
17. RICHARDSON, MALCOLM D., WARNOCK, David W. *Introduction. Fungal Infection: Diagnosis and Management*. John Wiley & Sons. 2012.
18. ISENBERG, H.D. Pathogenicity and virulence: another view. In: *Clinical Microbiology Reviews.*, 1988, no1(1), p.40-53.
19. KAISER, G. Overview of microbial pathogenesis. [Accesat: 08.07.2018]. Disponibil: [https://dynamic.libretexts.org/print/url=https://bio.libretexts.org/TextMaps/Microbiology/Book%3A\\_Microbiology\\_\(Kaiser\)/Unit\\_3%3A\\_Bacterial\\_Pathogenesis/1%3A\\_Overview\\_of\\_Microbial\\_Pathogenesis.pdf](https://dynamic.libretexts.org/print/url=https://bio.libretexts.org/TextMaps/Microbiology/Book%3A_Microbiology_(Kaiser)/Unit_3%3A_Bacterial_Pathogenesis/1%3A_Overview_of_Microbial_Pathogenesis.pdf).
20. CASADEVALL, A., PIROFSKI, L. Host pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. In: *Infect. Immun.*, 1999, vol.67, p.3703-13.
21. CALDERONE, R.A., BRAUN, P.C. Adherence and receptor relationships of *Candida albicans*. In: *Microbiol Rev.*, 1991, no55(1), p.1-20.
22. LOPEZ, C.M., WALLICH, R., RIESBECK, K. et al. *Candida albicans* uses the surface protein Gpm1 to attach to human endothelial cells and to keratinocytes via the adhesive protein vitronectin. In: *PLoS One*, 2014, no9(3), p.e90796. [Accesat: 21.09.2018]. Disponibil: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3953207/>
23. VERSTREPEN, K.J., KLIS, F.M. Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. In: *Mol. Microbiol.*, 2006, no60, p.5-15; PMID:16556216. [Accesat: 12.08.2018]. Disponibil: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05072.x>.
24. FANNING, S., MITCHELL, A.P. Fungal biofilms. In: *PLoS Pathog.*, 2012, 8:e1002585. [Accesat: 13.07.2018]. Disponibil: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1002585>.
25. GARCIA, M.C., LEE, J.T., RAMSOOK, C.B., ALSTEENS, D., DUFRÈNE, Y.F., LIPKE, P.N. A role for amyloid in cell aggregation and biofilm formation. In: *PLoS One*, 2011, no6, p.e17632. [Accesat: 13.07.2018]. Disponibil: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0017632>. 32.
26. TAPAN, M., JHINUK, B.M., RAUNAK, B. et al. Determination of Virulence Factors and Biofilm Formation Among Isolates of Vulvovaginal Candidiasis. In: *J. Med. Sci.*, 2016, no36(2), p.53-58.
27. KARKOWSKA-KULETA, J., RAPALA-KOZIK, M., and KOZIK, A. Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. In: *Acta Biochim. Pol.*, 2009, no56(2), p.211-224.
28. FILLER, S.G., EDWARD, J.E. Jr. Molecular basis of fungal adherence to endothelial and epithelial cells. In: F.S. Heitman, J.E. Edward Jr., A.P. Mitchell eds. *Molecular principles of fungal pathogenesis*. ASM Press: Washington DC, 2006, p.187-196.
29. CALDERONE, R.A., FONZI, W.A. Virulence factors of *Candida albicans*. In: *Trends Microbiol.*, 2001, no9(7), p.327-335.
30. LIU, Y., FILLER, S.G. *Candida albicans* Als3, a multifunctional adhesin and invasin. In: *Eukaryot. Cell.*, 2011, no10(2), p.168-173.
31. LATGE, J.P. The pathobiology of *Aspergillus fumigatus*. In: *Trends Microbiol.*, 2001, no9(8), p.382-389.
32. LONG, K.H., GOMEZ, F.J., MORRIS, R.E., NEWMAN, S.L. Identification of heat shock protein 60 as the ligand on *Histoplasma capsulatum* that mediates binding to CD18 receptors on human macrophages. In: *J. Immunol.*, 2003, no170(1), p.487-494.
33. BRANDHORST, T.T., WÜTHRICH, M., WARNER, T., KLEIN, B. Targeted gene disruption reveals an adhesin indispensable for pathogenicity of *Blastomyces dermatitidis*. In: *J. Exp. Med.*, 1999, no189(8), p.1207-16.
34. GONZÁLEZ, A., GÓMEZ, B.L., DIEZ, S., HERNÁNDEZ, O., RESTREPO, A., HAMILTON, A.J., CANO, L.E. Purification and partial characterization of a *Paracoccidioides brasiliensis* protein with capacity to bind to extracellular matrix proteins. In: *Infect. Immun.*, 2005, no73(4), p.2486-2495.
35. COLE, G.T., KIRKLAND, T.N., FRANCO, M., ZHU, S., YUAN, L., SUN, S.H., HEARN, V.M. Immunoreactivity of a surface wall fraction produced by spherules of *Coccidioides immitis*. In: *Infect. Immun.*, 1988, no56(10), p.2695-701.
36. HOSTETTER, M.K. Complement receptors in *Candida albicans*. In: *Clin. Immunol. Newsletter.*, 1991, no11(1), p.1.
37. HOSTETTER, M.K. Adhesins and ligands involved in the interaction of *Candida* spp. with epithelial and endothelial surfaces. In: *Clin. Microbiol. Rev.*, 1994, no7(1), p.9-42.
38. CRISANTO, M.L., REINHARD, W., KRISTIAN, R., et al. *Candida albicans* uses the surface protein Gpm1 to attach to human endothelial cells and to keratinocytes via the adhesive protein vitronectin. In: *PLoS.*, 2014, no9(3), p.e90796. [Accesat: 13.08.2018]. Disponibil: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3953207/>.
39. ROONEY, P.J., KLEIN, B.S. Linking fungal morphogenesis with virulence. In: *Cell Microbiol.*, 2002, no4(3), p.127-137.
40. SCHERWITZ, C. Ultrastructure of human cutaneous candidosis. In: *J. Invest Dermatol.*, 1982, no78, p.200-252.
41. RAY, T.L., PAYNE, C.D. Scanning electron microscopy of epidermal adherence and cavitation in murine candidiasis: A role for *Candida* acidproteinase. In: *Infect. Immun.*, 1988, no56, p.1942-1944.

42. BROWN, A.J., GOW, N.A. Regulatory networks controlling *Candida albicans* morphogenesis. In: *Trends Microbiol.*, 1999, no7(8), p.333-338.
43. CARUSO, M., SACCO, M., MEDOFF, G., MARESCA, B. Heat shock 70 gene is differentially expressed in *Histoplasma capsulatum* strains with different levels of thermotolerance and pathogenicity. In: *Mol. Microbiol.*, 1987, no1(2), p.151-158.
44. MEDOFF, G., SACCO, M., MARESCA, B., SCHLESSINGER, D., PAINTER, A., KOBAYASHI, G.S., CARRATU, L. Irreversible block of the mycelial-to-yeast phase transition of *Histoplasma capsulatum*. In: *Science*, 1986, no231(4737), p. 476-479.
45. CHANG, Y.C., PENoyer, L.A., KWON-CHUNG, K.J. The second capsule gene of *Cryptococcus neoformans*, CAP64, is essential for virulence. In: *Infect. Immun.*, 1996, no64(6), p.1977-1983.
46. BUCHANAN, K.L., MURPHY, J.W. What makes *Cryptococcus neoformans* a pathogen? In: *Emerg. Infect. Dis.*, 1998, no4(1), p.71-83.
47. ZARAGOZA, O., RODRIGUES, M.L., De JESUS, M., FRASES, S., DADACHOVA, E.A. The capsule of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. In: *Adv. Appl. Microbiol.*, 2009, no68, p.133-216.
48. VECCHIARELLI, A., PERICOLINI, E., GABRIELLI, E., KENNO, S., PERITO, S., CENCI, E., MONARI, C. Elucidating the immunological function of the *Cryptococcus neoformans* capsule. In: *Future Microbiol.*, 2013, no8, p.1107-1116.
49. FRASES, S., PONTES, B., NIMRICHTER, L., VIANA, N.B., RODRIGUES, M.L., CASADEVALL, A. Capsule of *Cryptococcus neoformans* grows by enlargement of polysaccharide molecules. In: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2009, no106, p.1228-1233.
50. GOKCE, G., CERIKCIOGLU, N., YAGCI, A. Acid proteinase, phospholipase and biofilm production of *Candida* species isolated from blood cultures. In: *Mycopathologia*, 2007, no164(6), p.265-269.
51. NAGLIK, J.R., CHALLACOMBE, S.J., HUBE, B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. In: *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2003, no67(3), p.400-28.
52. CHEN, S.C., WRIGHT, L.C., GOLDING, J.C., SORRELL, T.C. Purification and characterization of secretory phospholipase B, lysophospholipase and lysophospholipase/transacylase from a virulent strain of the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. In: *Biochem. J.*, 2000, no347(Pt 2), p.431-9.
53. GHANNOUM, M.A. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. In: *Clin. Microbiol. Rev.*, 2000, no13(1), p.122-43.
54. PIETRELLA, D., RACHINI, A., PANDEY, N., SCHILD, L., NETEA, M., BISTONI, F., HUBE, B., VECCHIARELLI, A. The Inflammatory response induced by aspartic proteases of *Candida albicans* is independent of proteolytic activity. In: *Infect. Immun.*, 2010, no78(11), p.4754-62.
55. RAPPLEYE, C.A., GOLDMAN, W.E. Defining virulence genes in the dimorphic fungi. In: *Annual Rev. Microbiol.*, 2006, no60, p.281-303.
56. KAMATH, P., SUBRAHMANYAM, V.M., RAO, J.V., RAJ, P.V. Optimization of Cultural Conditions for Protease Production by a Fungal Species. In: *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2010, no72(2), p.161-166.
57. SUMATHY, R., VIJAYALAKSHMIM, M., DEECARAMAN, M. Studies on Lipase production from fungal strains by different inducers at varied concentrations – A comparative study. In: *International Journal of Environmental sciences*. Volume 3, 2012, no3, p.1072-1078.
58. SAROJ et al. *Bioresour. Bioprocess.* (2018) 5:31. [Accesat: 31.08.2018] Disponibil: <https://doi.org/10.1186/s40643-018-0216-6>.
59. SANCHEZ, A., ESCANDON, P., CASTANEDA, E. In vitro determination of virulence factors activity associated with several *Cryptococcus neoformans* clinical isolates. In: *Rev. Iberoam Micol.*, 2008, no25(3), p.145-149.
60. JOHNSON, C.H., KLOTZ, M.G., YORK, J.L., KRUF, V., McEWEN, J.E. Redundancy, phylogeny and differential expression of *Histoplasma capsulatum* catalases. In: *Microbiology*, 2002, no148(Pt 4), p.1129-1142.
61. BROWN, A.J., ODDS, F.C., GOW, N.A. Infection-related gene expression in *Candida albicans*. In: *Curr. Opin. Microbiol.*, 2007, no10(4), p.307-313.
62. BROWN, S.M., CAMPBELL, L.T., LODGE, J.K. *Cryptococcus neoformans*, a fungus under stress. In: *Curr. Opin. Microbiol.*, 2007, no10(4), p.320-325.
63. REMENTERIA, A., LÓPEZ-MOLINA, N., LUDWIG, A., VIVANCO, A.B., BIKANDI, J., PONTÓN, J., GARAIZAR, J. Genes and molecules involved in *Aspergillus fumigatus* virulence. In: *Rev. Iberoam. Micol.*, 2005, no22(1), p.1-23.
64. WANG, Y., AISEN, P., CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* melanin and virulence: Mechanism of action. In: *Infect. Immun.*, 1995, no63, p.3131-3136.
65. Van DUIN, D., CASADEVALL, A., NOSANCHUK, J.D. Melanization of *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum* reduces their susceptibilities to amphotericin B and caspofungin. In: *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2002, no46, p.3394-3400.

66. SCHRETTL, M., BIGNELL, E., KRAGL, C., JOECHL, C., ROGERS, T., ARST, H.N. Jr., HAYNES, K., and HAAS, H. Siderophore biosynthesis but not reductive iron assimilation is essential for *Aspergillus fumigatus* virulence. In: *J. Exp. Med.*, 2004, no200(9), p.1213-1219.
67. EISENDLE, M., OBEREGGER, H., ZADRA, I., HAAS, H. The siderophore system is essential for viability of *Aspergillus nidulans*: functional analysis of two genes encoding l-ornithine N 5-monooxygenase (sidA) and a non-ribosomal peptide synthetase (sidC). In: *Mol. Microbiol.*, 2003, no49(2), p.359-375.
68. KNIGHT, S.A., VILAIRE, G., LESUISSE, E., DANCIS, A. Iron acquisition from transferrin by *Candida albicans* depends on the reductive pathway. In: *Infect. Immun.*, 2005, no73(9), p.5482-5492.
69. TOMEE, J.F., KAUFFMAN, H.F. Putative virulence factors of *Aspergillus fumigatus*. In: *Clin. Exp. Allergy*, 2000, p.30(4), p.476-484.
70. WILSON, B.J. Toxins other than aflatoxins produced by *Aspergillus flavus*. In: *Bacteriological Reviews*, 1966, no30(2), p.478-484.
71. ZOHRI et al. Impact of Enzymes and Toxins Potentiality of Four *Aspergillus* Species to Cause Aspergillosis. In: *Biol. Med. (Aligarh)*, 2017, no9, p.5. DOI: 10.4172/0974-8369.1000409
72. STEINBACH, W.J., CRAMER, R.A.Jr., PERFECT, B.Z., ASFAW, Y.G., SAUER, T.C., NAJVAR, L.K., KIRKPATRICK, W.R., PATTERSON, T.F., BENJAMIN, D.K. Jr., HEITMAN, J., PERFECT, J.R. Calcineurin controls growth, morphology, and pathogenicity in *Aspergillus fumigatus*. In: *Eukaryot Cell.*, 2006, no5(7), p.1091-103.
73. WONG, B., PERFECT, J.R., BEGGS, S., WRIGHT, KA. Production of hexitol D-mannitol by *Cryptococcus neoformans* in vitro and in rabbits with experimental meningitis. In: *Infect Immun.*, 1990 Jun., no58(6), p.1664-1670.
74. NOBILE, C.J., JOHNSON, A.D. *Candida albicans* Biofilms and Human Disease. In: *Annual Review of Microbiology*, 2015, no69, p.71-92.
75. KUMAR, A., THAKUR, V.C., THAKUR, S., KUMAR, A., PATIL, S. Caracterizarea fenotipică și examinarea in vitro a potențialilor factori de virulență ai speciilor *Candida* izolate din infecția cu flux sanguin. In: *World Journal of Science and Technology*, 2011, no1, p.38-42.
76. ALI, Q.S., FARID, A.J., KABEIR, B.M., ZAMBERI, S., SHUHAIMI, M., GHAZALI, H.M., YAZID, A.M. Proprietățile de adeziune ale *Bifidobacterium Pseudocatenulatum* G4 și *Bifidobacterium Longum* BB536 pe linia celulară epitelială umană HT-29 la diferite perioade și pH. In: *Academia Mondială de Știință, Inginerie și Tehnologie*, 2009, no25, p.123-127.
77. MATTIA, E., CARRUBA, G., ANGIOLELLA, L., et al. Induction of germ tube formation by N-acetyl-D-glucosamine in *Candida albicans*: uptake of inducer and germinative response. In: *J. Bacteriol.*, 1982, no152(2), p.555-562.
78. ROSENBERG, M., GUTNICK, D., ROSENBERG, E. Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. In: *FEMS Microbiol. Let.*, 1980, no9(1), p.29-33.
79. OKSUZ, S., SAHIN, I., YILDIRIM, M., GULCAN, A., YAVUZ, T., KAYA, D., KOC, A.N. Phospholipase and proteinase activities in different *Candida* species isolated from anatomically distinct sites of healthy adults. In: *Jpn. J. Infect. Dis.*, 2007, no60(5), 280-283. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17881867>
80. MOHAN, V., BALLAL, M. Proteinază și activitatea fosfolipazei ca factori de virulență la speciile de *Candida* izolate din sânge. In: *Rev. Iberoam. Micol.*, 2008, no25, p.208-210.
81. HASAN, F., SHAH, A., HAMEED, A. Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review. In: *Biotechnol. Adv.*, 2009, no27, p.782-798.

**Date despre autor:**

**Olga BURDUNIUC**, doctor în științe medicale; conferențiar cercetător, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”; șef de laborator „Microbiologie” la Agenția Națională pentru Sănătate Publică.

**E-mail:** olgaburduniuc3@gmail.com

Prezentat la 07.10.2018