

Biofilmele fungice : strategii de supraviețuire

LUMINIȚA - IULIANA MALIC ^{*1}, INGRID CEZARA APETREI ², MIHAI MAREȘ ^{1,3}

(1)Laboratorul de Micologie-Micotoxicologie, (2)Laboratorul de Microbiologie, Departamentul de Sănătate Publică - USAMV «Ion Ionescu de la Brad», (3)Departamentul de Cercetare al Universității «Petre Andrei» - Iași, România

Primit (Received): 27.03.2007 / Acceptat (Accepted) : 04.04.2007

Fungal biofilms: survival strategies

Abstract. Pathogenic fungi in the genus *Candida* can cause both superficial and systemic diseases, and are now recognized as major agents of hospital-acquired infections. *Candida* infections involve the formation of biofilms on catheters or other prosthetic devices. Biofilms of *Candida albicans* consist of matrix enclosed microcolonies of yeasts and hyphae, arranged in a superposed structure. The biofilm is resistant to a range of antifungal agents currently in clinical use, including amphotericin B and fluconazole, and it appears to be a multiple resistance mechanism. The lack of reactivity of these organized communities to main antifungals or other existing decontaminants is already proved. The mechanisms by which *Candida* biofilms resist to the action of antifungal agents are not well known. Possible resistance mechanisms include drug exclusion by the biofilm matrix and phenotypic changes resulting from nutrient limitation or a low growth rate. The results of previous studies have demonstrated the fact that the yeasts embedded in biofilm matrix exhibit resistance to main antifungals in all stages of its growing and development, while the planktonic forms belong to the same species have proved rarely resistance and only in early stages of growing.

Keywords: *biofilm, matrix, yeasts, antifungals, resistance*

Rezumat. Fungii patogeni aparținând genului *Candida* pot cauza numeroase infecții superficiale și sistemice, fiind recunoscuți ca principali agenți cauzali ai infecțiilor micotice nosocomiale. Infecțiile cu levuri aparținând genului *Candida* se datorează formării de biofilme pe suprafața cateterelor sau a diferitelor dispozitive protetice. Biofilmele de *Candida* sunt constituite din microcolonii de levuri și hife, sub forma unor structuri etajate, înglobate într-o matrice polizaharidică. Biofilmele prezintă mecanisme multiple de rezistență la o gamă variată de agenți antifungici, utilizați în prezent în terapie, inclusiv amfotericina B și fluconazolul. Rezistența acestor comunități bine organizate la antifungice și substanțe decontaminante este demonstrată, dar mecanismele prin care biofilmele aparținând genului *Candida* reușesc o asemenea performanță nu sunt în totalitate cunoscute. O posibilă explicație a mecanismului de rezistență poate fi aceea a modificărilor fenotipice datorate limitării aportului de nutrienți sau scăderii ratei de creștere a microorganismelor incluse în biofilm. Rezultatele diverselor studii au demonstrat faptul că levurile incluse în structura biofilmului au manifestat rezistență la antifungice în toate etapele de creștere și dezvoltare ale acestuia, în timp ce formele planctonice aparținând aceleași specii s-au dovedit rareori rezistente și doar în fazele incipiente de creștere.

Cuvinte cheie: *biofilm, matrice, levuri, antifungice, rezistență*

Organizarea microorganismelor - bacterii sau fungi, sub formă de biofilme, s-a dovedit a fi cea mai complexă formă de rezistență a indivizilor găzduiți în rețeaua polizaharidică. Această rezistență se manifestă atât față de agenții antimicrobieni (antibiotice și antifungice), cât și față de agenții decontaminanți utilizați în operațiunile de sanitație (1). Mecanismele prin care aceste structuri se „apără” de numeroșii factori nocivi exogeni sunt incomplet cunoscute, dar fac în permanență obiectul a numeroase studii în lumea întregă. Noțiunea de biofilm a fost descrisă pentru prima dată în lumea științifică de către Antonie van Leeuwenhoek care, a examinat așa numitele „animalcules” de pe propria dantură în secolul XVII. Teoria de bază asupra formării biofilmelor a fost lansată însă în 1978 (2,3). Potrivit acestei teorii, majoritatea micro - organismelor cresc și se dezvoltă în interiorul unor structuri autogenerate care le conferă aderență la orice tip de suprafață, în condițiile în care să beneficieze de resurse nutriționale. Aceste forme de existență

* Dr. Malic Luminița, Departamentul de Sănătate Publică, USAMV «Ion Ionescu de la Brad», Aleea Mihail Sadoveanu nr. 8, 700489 – Iași, Romania, e-mail: luminitamalic@gmail.com

ale microorganismelor diferă morfo-funcțional de formele planctonice, individuale, izolate, ce pot fi apreciate ușor din punct de vedere cantitativ. Această teorie a fost confirmată ulterior prin studii diversificate ce au inclus diferite spații și suprafețe. Astfel, primele studii s-au concentrat asupra analizării ecosistemelor acvatice cu ajutorul observațiilor microscopice și a aprecierilor calitative și cantitative (1,2). De asemenea, alte studii au vizat demonstrarea supoziției care se referea la existența microorganismelor incluse în biofilme la nivelul diverselor suprafețe din ecosisteme naturale (peșteri, medii acvatice), spații habituale (locuințe, birouri), rețea de distribuție a apei potabile, picturi, sculpturi, monumente, etc (3, 4, 5, 6, 7, 8, 9).

Un semnal de alarmă a fost tras de specialiștii microbiologi din întreaga lume în momentul descoperirii acestor „comunități” microscopice pe diverse suprafețe existente în incinte aparținând industriei alimentare, dar mai ales pe instrumentarul medical cunoscut ca fiind „liber de germeni” precum: catetere, proteze, implanturi, sonde (10, 11, 12, 13).

Metodele de examinare a biofilmelor au demonstrat că microorganismele responsabile de aceste contaminări, dar și de o serie de infecții cronice, se găsesc înglobate în matrici polizaharidice cunoscute în literatura anglo-saxonă ca „matrix” sau „slime” (14,15). Acest tip de organizare conferă microorganismelor protecție față de acțiunea substanțelor decontaminante sau antimicrobiene - antibiotice și antifungice (16). Actuala definiție a biofilmelor reprezintă consecința acumulării de noțiuni și a studiilor efectuate asupra acestor forme de organizare în ultimii 25 de ani (2,17). În 1979, Marshall sugera existența unei rețele polimerice extracelulare, cu rol în asigurarea aderenței la diverse suprafețe (16). Costerton *et al.* confirmă faptul că bacteriile grupate sub formă de comunități în sistemele acvatice sunt înglobate într-o matrice (glicocalix), care s-a dovedit a fi constituită din polizaharide existente în mediu (17). Un alt rol al acestei structuri polizaharidice este acela de a realiza legături intercelulare facilitând utilizarea tuturor surselor nutriționale (18, 19, 20).

Definirea noțiunii de biofilm nu trebuie să ia în considerare doar aspectele observabile și anume, faptul că microorganismele sunt atașate ireversibil de o suprafață prin încadrarea acestora în interiorul matricii extracelulare de natură polimerică pe care aceste celule o produc și în care sunt incluși și mulți componenți abiotici. Un rol esențial îl au caracteristicile fiziologice ale acestor organisme, precum rata diminuată de creștere și faptul că

exprimă gene care nu există la formele planctonice, libere.

Cele mai multe informații cu privire la structura și caracteristicile biofilmelor ce conțin levuri aparținând speciei *Candida albicans* provin din efectuarea a numeroase observații asupra modelelor de studiu realizate *in vitro* de către diferite echipe de cercetători. Aceste modele experimentale au utilizat ca suport solid pentru formarea biofilmelor: catetere, comprese și eprubete fabricate din diferite materiale, perfuzoare, proteze, medii de cultivare, plăci cu godeuri, culturi de celule, alte suprafețe (21, 22, 23, 24, 25, 26, 27). Aceste experimente au fost realizate atât în condiții statice cât și în condiții dinamice, de perfuzare continuă cu oxigen sau nutrienți. De asemenea, au fost folosite animale de experiență pentru testarea contaminării cu levuri aparținând speciei *Candida albicans* în urma implantării unui cateter, urmărindu-se formarea *in vivo* a biofilmelor și gradul de asemănare structurală cu modelul realizat *in vitro*. Biofilmele au fost prelevate și direct de la pacienți și evidențiate cu ajutorul diferitelor tehnici microscopice, în special cu ajutorul microscopiei confocale cu laser (28, 29, 30).

În dezvoltarea sa, biofilmul urmărește parcurgerea unor etape stricte, care-i vor favoriza evoluția ulterioară și rezistența la factorii externi. Aceste etape sunt:

- Transportul;
- Realizarea aderenței inițiale;
- Atașarea de substrat;
- Formarea microcoloniilor (aderența între celule);
- Maturarea biofilmului (aderența dintre celule și matricea exo-polimerică) (31, 32, 33).

Pentru a coloniza orice tip de suprafață, celulele levurice trebuie inițial să adere la aceasta. Atașarea primară a celulelor de *Candida* pe suprafața suport este un fenomen mediat de factori nespecifici (forțele hidrostactice și electrostatice de la nivelul celulelor) și de către aderența specifică a fungilor la unele substanțe de tip proteic - fibrinogen și fibronectină (34, 35, 36).

Studii recente au arătat că aderența specifică poate fi mediată de către proteinele existente la suprafața celulelor, cum sunt cele aparținând grupului ALS și EAP 1. Supleментар celulele de *Candida* pot conviețui împreună cu diferite celule bacteriene. Atașarea inițială la orice suprafață are un rol esențial în dezvoltarea ulterioară a structurilor biofilmului. Biofilmul matur ce conține celule aparținând genului *Candida* se prezintă ca o rețea cu structură tridimensională ce

manifestă heterogenitate spațială (37, 38, 39, 40, 41, 42).

Substratul în cauză poate fi refractar la potențialul colonizator al microorganismelor datorită gradului mare de ocupare a suprafețelor existente și a lipsei unor situsuri de legare libere. În alte cazuri, celulele libere, planctonice, pot înlocui pelicula incipientă a biofilmului prin deținerea unor proprietăți de aderare superioare sau o afinitate mai mare la un anumit substrat, dar acest fapt este posibil doar în primele stadii de formare când liantul polizaharidic este prezent în cantitate redusă și nu este complet fixat. Durata acestei faze depinde indirect de potențialul metabolic al fiecărui situs, din componența biofilmului. Când are loc recolonizarea unui substrat, se schimbă și gradul de interacțiune între primele microorganisme colonizatoare și cele nou venite, pe măsura aderării acestora la suprafața biofilmului încă imatur (40, 41, 42).

Microorganismele pot forma agregate celulare în suspensie lichidă, care ulterior vor fi sechestrate la periferia matrixului, chiar dacă nu aparțin aceleași clase de microorganisme. Prin alternanță, între substraturile excentrice de microorganisme și cele mai profunde, se pot stabili relații de parteneriat în scop nutrițional chiar și prin utilizarea metaboliților rezultați din activitatea straturilor superficiale. Stabilirea la nivelul biofilmelor a unor parteneriate între două sau mai multe specii microbiene poate avea drept consecință eliminarea altora. Pe măsură ce matrixul se îngroașă, crescând densitatea și heterogenitatea microorganismelor componente, devine din ce în ce mai evident că straturile superficiale, prin impunerea unui gradient de pH generat de activitatea metabolică proprie, vor determina o presiune de selecție menită să asigure un echilibru dinamic între membrii comunității respective indiferent de "etnicitatea" acestora.

Un biofilm matur se prezintă sub forma unei structuri matriceale dispusă în rețea, cu diverse canale orizontale și verticale care permit circulația lichidelor cu rol important în asigurarea substraturilor nutritive și eliminarea reziduurilor celulare ce apar în urma proceselor de respirație celulară a indivizilor găzduiți în comunitatea virtuală. În dezvoltarea și supraviețuirea unui biofilm, un rol esențial îl au factorii intrinseci și extrinseci: speciile componente, temperatura de creștere, pH-ul, compoziția mediului de creștere, prezența diferitelor săruri, etc. (43, 44, 45, 46, 47).

Cu toate acestea, pe parcursul procesului de maturare a biofilmului, posibilitatea succesiunii microbiene la nivelul situsurilor matriceale

profunde rămâne deschisă, deși este în mare măsură dependentă de succesul aderării unor specii alohtone în vederea supraviețuirii ulterioare intracomunitare. Ulterior, ca o consecință a dezvoltării asociative, sub influența unor presiuni de selecție, maturarea biofilmului înseamnă și câștigarea unei rezistențe la viitoarele colonizări microbiene (homeostazie microbială). Rezistența la colonizare a biofilmelor a fost demonstrată pe animale gnotobiotice ce sunt ferite de microflora naturală și drept consecință sunt mai susceptibile la dezvoltarea de infecții sub influența florei bacteriene autohtone (proprii). În mod similar crește susceptibilitatea animalelor, a căror microfloră a fost degradată de antibioterapie sau radioterapie, de a dezvolta procese morbide lipsind influența antagonică, de balans, a nișelor proprii microbiene.

Biofilmele, ca și comunități afectate de expunerea cronică la tratamentele antimicrobiene / decontaminări, vor suferi destabilizări a căror consecință va fi creșterea permisivității comunitare în sensul acceptării de noi specii de microorganisme mai rezistente, ceea ce va conduce la sporirea gradului de adaptabilitate a matrixului și la sporirea continuă a profilului de rezistență a acestuia în scopul menținerii integrității funcționale.

Hawser și Douglas au examinat biofilme formate de *C. albicans* pe suprafața unor catetere cu ajutorul microscopiei electronice în *scanning* (SEM) (45, 48). Etapa de atașare inițială a celulelor levurice a fost urmată de formarea tubilor germinativi pe parcursul a 3 până la 6 ore. După 24-48 de ore de incubare, biofilmul matur de *C. albicans* constă dintr-o rețea densă de levuri, hife, pseudohife și material extracelular de natură polizaharidică, vizibilă pe suprafața suport. Condițiile de creștere utilizate de acești cercetători nu favorizează filamentarea celulelor levurice existente în stare planctonică. Utilizarea acestei metode de studiu a evidențiat structura tridimensională a biofilmului, mai ales heterogenitatea spațială și arhitectura microcoloniilor împreună cu multiplele canale ramificate prin care circulă apa. De asemenea, s-a putut aprecia grosimea unui biofilm, ce variază între 25 și 450 μm (23, 49, 50).

Microscopia electronică de baleiaj este utilizată în prezent pentru detectarea biofilmelor de pe instrumentarul medical și dispozitivele implantabile. Datorită excelentelor proprietăți de iluminare și detecție, acest tip de microscopie este instrumentul cel mai uzitat pentru identificarea biofilmelor.

Prin utilizarea microscopiei confocale cu laser și a celei cu fluorescență se pot evidenția și

studia microorganismele din interiorul unui biofilm cu ajutorul markerilor fluorescenți. Acești coloranți sunt destinați emiterii de fluorescență la valori diferite ale lungimii de undă și pot fi folosiți pentru analizarea diferitelor structuri celulare. De exemplu, coloranți ai acizilor nucleici precum: DAPI (4',6'-diamino-2-fenilindol), acridină orange și *Syto 9* vor marca ADN-ul și ARN-ul celulelor viabile. Iodura de propidiu marchează doar membranele citoplasmice degradate, iar 5-cyano-2,3-ditoly-clorură de tetrazolium este redus la 5-cyano-2,3-ditoly-clorură de tetra-zolium – formazan doar de către celulele cu sistem citocromic funcțional. Utilizând astfel de markeri este posibilă studierea biofilmelor prin vizualizarea tuturor celulelor componente și identificarea celor viabile (2).

Studii recente care au utilizat microscopia confocală cu laser au demonstrat faptul că biofilmele conținând celule de *Candida albicans* și *Candida dubliniensis* au structură 3D similară, ce constă în existența de microcolonii înconjurate de canale de apă. De asemenea, a fost demonstrată structura bistratificată a hifelor de *Candida albicans* atunci când biofilmele cresc pe suprafețe din plastic (51, 52).

Pentru a caracteriza proprietățile biofilmelor de *Candida* sunt utilizate diferite modele experimentale. Majoritatea sunt adaptări ale metodelor utilizate pentru studiul biofilmelor bacteriene. Cele mai simple și mai des utilizate implică favorizarea creșterii de comunități populaționale pe suprafața unor porțiuni de cateter. Creșterea este apreciată cantitativ prin utilizarea unor metode colorimetrice care depind de reducerea unei sări de tetrazolium sau prin încorporarea de H-leucină. Ambele metode redau cu precizie dimensiunile biofilmelor.

Un model experimental similar, a utilizat, fragmente de materiale acrilice destinate protezelor dentare amovibile pentru obținerea de biofilme *in vitro*. Pentru o expeditivitate a procesării unui număr mare de probe, biofilmele pot fi cultivate în microplăci de titrare cu 96 de godeuri. Această metodă este recomandată pentru testarea susceptibilității biofilmelor la agenții antifungici. Toate aceste metode au rolul de a permite obținerea biofilmelor în condiții statice de incubare (27, 53, 54, 55).

In vivo, dezvoltarea biofilmelor se realizează în condiții de flotație. În laborator, aceste condiții de creștere pot fi mimate prin imersivitatea și ușoara agitare a porțiunilor de cateter în interiorul unui mediu de cultivare aflat în stare lichidă. De asemenea, au fost realizate și sisteme sofisticate de cultivare, care presupun formarea biofilmelor pe

suporturi de natură celulozică în biofermentatoare - dispozitive specializate, cu parametri controlabili, destinate obținerii în condiții artificiale a biofilmelor. Biofermentatorul este cel mai specializat sistem prin care se poate aprecia cu acuratețe gradul de creștere a biofilmelor (56, 57, 58, 59).

Există numeroși factori care pot afecta creșterea și dezvoltarea biofilmelor. S-au stabilit deja corelații între abilitatea de a forma biofilme și patogenitate, atunci când specii diferite ale genului *Candida* au fost testate prin metoda creșterii pe discuri din catetere. Izolate clinice aparținând speciilor *C. parapsilosis*, *C. kefyr* și *C. glabrata* au manifestat o capacitate redusă de a forma biofilme comparativ cu indivizii aparținând speciei *C. albicans*. Pe de altă parte, celulele levurice aparținând speciilor *C. tropicalis* și *C. parapsilosis* formează mult mai rapid biofilme atunci când mediul conține 8% glucoză. Această proprietate poate fi folosită pentru prevenirea apariției candidemiilor la pacienții alimentați parenteral cu soluții ce conțin cantități ridicate de glucoză (60, 61, 62).

Materialul din care este confecționat cateterul influențează formarea biofilmelor de *C. albicans*, fapt demonstrat prin metoda ce utilizează discuri din cateter. Formarea biofilmelor a fost mai crescută pe latex sau elastomerii din silicon comparativ cu cea observată pe clorura de polivinil, dar considerabil scăzută pe poliuretan sau silicon pur. *In vivo*, cateterele sau alte implanturi absorb rapid proteinele gazdă, care formează un substrat favorabil pentru aderarea ulterioară a levurilor pe suprafața implantului. O preincubare a discurilor din catetere confecționate din clorură de polivinil împreună cu un amestec format din fibrinogen și collagen, îmbunătățește formarea biofilmelor de *C. albicans*. În condiții similare se formează biofilmele pe proteze dentare de acrilat sub influența proteinelor serice sau a salivei (60, 63, 64, 65).

O caracteristică esențială în formarea unui biofilm este prezența matricii extracelulare polimerice produsă de microorganisme și în care acestea sunt înglobate. Matricea extracelulară se evidențiază mult mai bine atunci când biofilmele de *C. albicans* sunt incubate sub agitare ușoară, decât în cazul poziționării statice. În aceste condiții, microorganismele sunt practic ascunse și protejate în rețeaua polizaharidică dezvoltată (67).

Mulți cercetători au demonstrat faptul că biofilmele de *C. albicans* prezintă o rezistență crescută la acțiunea agenților antifungici. Cu toate acestea, formule medicamentoase nou apărute pe piața farmaceutică - cum ar fi echinocandinele și

formele lipozomale ale amfotericinei B prezintă eficiență crescută asupra acestor biofilme (68, 69). Determinarea eficienței unor antifungice asupra biofilmelor de *C. albicans* prezintă importanță clinică prin ghidarea alegerii procedurii terapeutice la pacienții ce suferă de aceste afecțiuni „greu tratabile”.

Folosind metoda experimentală de realizare a biofilmelor prin tehnica microplăcilor de titrare, urmată de adăugarea în mediul respectiv a unor antifungice, în diferite etape de creștere, a fost determinată și standardizată susceptibilitatea microorganismelor incluse în biofilm la acțiunea antifungicelor testate. Experimentul a dovedit faptul că activitatea metabolică a celulelor din structura biofilmului se poate evalua prin reducția 2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolium-5-carboxanilidei (XTT), produsul rezultat putând fi dozat cu ajutorul unui spectrofotometru (67).

Rezistența biofilmelor se datorează unui complex de fenomene care nu sunt încă pe deplin cunoscute (68,69). Multe mecanisme pot fi responsabile de rezistența intrinsecă a biofilmelor formate de specii ale genului *Candida*. Între acestea se remarcă :

- Densitatea crescută a celulelor în structura biofilmului
- Rețeaua matriceală extracelulară
- Rata de creștere scăzută și limitarea nutrițională
- Existența genelor de rezistență, în special a celor care codifică pompele de eflux

Multe dintre aceste mecanisme, relatate în cazul biofilmelor bacteriene, apar și în cazul biofilmelor levurice sau a celor mixte, levuro – bacteriene.

Matricea exopolimerică este produsă de celulele microbiene „capturate” în biofilm și poate acționa ca barieră în difuzia substanțelor antimicrobiene și/sau ca o „rezină schimbătoare de ioni” care cuplează antibioticele. În cazul biofilmelor levurice, care se dezvoltă în condiții diferite (mediu lichid sau solid), rezistența la antifungice datorată matricii extracelulare este la fel de ridicată. În cazul izolării de celule din interiorul biofilmului și testării lor separate la acțiunea fluconazolului și a amfotericinei B, acestea au prezentat de asemenea rezistență, dar nu la același nivel ca biofilmele din care au fost prelevate.

Studii numeroase au urmărit examinarea efectelor pe care le au rata de creștere și limitarea nutrițională întâlnite în biofilme asupra rezistenței acestora la acțiunea substanțelor antifungice. Baillie și Douglas au demonstrat faptul că biofilmele ajunse la faza de maturitate au prezentat o rezistență

crescută la acțiunea amfotericinei B, indiferent de modul lor de obținere (55). Chandra *et al.*, după numeroase studii, au ajuns la concluzia că rezistența biofilmelor la acțiunea antifungicelor se datorează activității metabolice crescute din timpul creșterii biofilmului, iar gradul cel mai ridicat de rezistență apare în cazul maturizării totale a biofilmului (59). Aceiași autori au realizat un model experimental simplu și ușor reproductibil, prin crearea biofilmelor dentare de *C. albicans*. În acest experiment, a fost inoculată pe o suprafață acrilică o suspensie de 1×10^7 celule levurice / ml. Timpul de contact cu suprafața solidă (necesar aderării levurilor) a fost de 90 de minute, iar perioada de creștere și dezvoltare a biofilmului a fost de 72 de ore. Suprafața acrilică a fost pretratată cu salivă, pentru o mai bună fixare, și incubată într-un mediu lichid îmbunătățit cu glucoză. Aceste biofilme au fost puse în contact cu diferite concentrații de antifungice. Celulele de *C. albicans* dezvoltate în interiorul biofilmului au manifestat rezistență la amfotericina B, nistatin, clorhexidină și fluconazol, cu o reducere a ratei metabolice de 50% la concentrații de 8, 16, 128, respectiv $>64 \mu\text{g} / \text{ml}$. În cazul formelor plactonice ale aceleași specii levurice, reducerea ratei metabolice la 50 % a avut loc la concentrații de 0.25, 1.0, 4.0, respectiv $0.5 \mu\text{g} / \text{ml}$ (69, 70).

În cazul microorganismelor aflate în stare planctonică, unul din cele mai importante mecanisme de rezistență la chimioterapice este cel al pompelor de eflux, prin care moleculele xenobiotice indezirabile sunt dirijate către exteriorul celulei. Genele care codifică aceste pompe de eflux, CDR și MDR, au fost identificate și în cazul biofilmelor, dezvoltate atât *in vivo* cât și *in vitro* (71).

Analiza sterolilor a evidențiat un nivel mai crescut de ergosterol în etapele intermediare și de maturare a biofilmelor, comparativ cu stadiile incipiente de creștere. Cunoscându-se faptul că metabolismul sterolului este primul afectat de acțiunea medicamentelor antifungice de tip azolic, nivelul scăzut de ergosterol în primele faze de dezvoltare a biofilmelor denotă un grad scăzut de rezistență la tratamentele antifungice a celulelor de *C. albicans* în aceste etape (72, 73).

Abilitatea levurilor de a forma biofilme este strâns legată de capacitatea de a cauza infecții profunde, invazive, uneori deosebit de grave. Prin manifestarea unei rezistențe crescute la acțiunea substanțelor antifungice și la mecanismele de apărare proprii organismului contaminat, biofilmele ce au în structura lor intimă levuri aparținând genului *Candida* reprezintă permanent pentru

clinicieni o provocare în stabilirea protocolului terapeutic corespunzător candidemiilor catetero-induse.

Pentru cunoașterea mecanismelor intime ce intervin în exprimarea rezistenței la acțiunea substanțelor antifungice, studiile de biologie moleculară efectuate asupra celulelor din structura biofilmelor reprezintă varianta optimă de studiu. Astfel, vor fi cunoscute toate condițiile ce favorizează apariția biofilmelor microbiene *in vivo* dar și crearea de materiale și strategii terapeutice care pot inhiba formarea și dezvoltarea biofilmelor.

Bibliografie

1. Douglas L J – *Candida* biofilms and their role in infection; *Trends in Microbiology*. 2003; 11(1):30-37.
2. Donlan R M, Costerton J W – Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms; *Clinical Microbiology Reviews* 2002; 15(2):167-193.
3. Costerton J W, Lewandowski Z, Caldwell D E *et al.* – Microbial biofilms; *Annual Reviews of Microbiology* 1995; 49:711-745.
4. McLandsborough L, Rodriguez A, Perez-Conesa D *et al.* – Biofilms: at the interface between Biophysics and Microbiology; *FOBI* 2006; 1:114-119.
5. Donlan L J – Biofilms: microbial life on surfaces; *Emerging Infectious Diseases* 2002; 8(9):881-890.
6. Frank J F – Microbial attachment to food contact surfaces; *Advances in Food and Nutrition Research* 2001; 43:319-370.
7. Kumar C G, Anand S K – Significance of microbial biofilms in food industry: a review; *International Journal of Food Microbiology* 1998; 42(1-2):9-27.
8. Jenkinson H F, Lappin-Scott H M – Biofilms adhere to stay; *Trends in Microbiology* 2001; 9(1):9-10.
9. VEDIYAPPAN G, CHAFFIN W L – Non-glucan attached proteins of *Candida albicans* biofilm formed on various surfaces; *Mycopathologia* 2006; 161:3-10.
10. Elving G J, Mei H C van der, Busscher H J *et al.* – Comparison of the microbial composition of voice prosthesis biofilms from patients requiring frequent versus infrequent replacement; *Annals of Otolaryngology Rhinology Laryngology* 2002; 111(1):200-203.
11. Gottlieb K, Mobarhan S – Review: microbiology of the gastrostomy tube; *Journal of the American College of Nutrition* 1994; 13(4):311-313.
12. Kojic E M, Darouiche R O – *Candida* infections of medical devices. *Clinical Microbiology Reviews* 2004; 17(2):2558-267.
13. Branda S S, Vik A, Friedman L *et al.* – Biofilms: the matrix revisited; *Trends in Microbiology* 2005; 13(1): 20-26.
14. Sutherland I W – The biofilm matrix - an immobilized but dynamic microbial environment; *Trends in Microbiology* 2001; 9:222-227.
15. Baillie G S, Douglas L J – Matrix polymers of *Candida* biofilms and their possible role in biofilm resistance to antifungal agents; *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2000; 46:397-403.
16. Marshall K C – *Interfaces in microbial ecology*; Cambridge: Harvard University Press; 1976.
17. Costerton J W, Geesey G G, Cheng G K – How bacteria stick; *Scientific American* 1978; 238:86-95.
18. Costerton J W, Cheng K J, Geesey G G *et al.* – Bacterial biofilms in nature and disease; *Annual Reviews of Microbiology* 1987; 41:435-464.
19. Characklis, W G, Marshall K C. *Biofilms: a basis for an interdisciplinary approach*. In: Characklis W G, Marshall K C (eds). *Biofilms*; London: John Wiley & Sons Publisher, 1990: 3-15.
20. Ramage G, Saville S P, Thomas D P *et al.* – *Candida* biofilms: an update – minireview; *Eukaryotic Cell* 2005; 4(4):633-638.
21. Chandra J, Kuhn D M, Mukherjee P K *et al.* Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *Journal of Bacteriology* 2001; 183:5385-5394.
22. Hawser S - Adhesion of different *Candida* spp. to plastic: XTT formazan determinations – *Journal of Medical and Veterinary Mycology* 1996; 34:407-410.
23. Hawser S - Comparisons of the susceptibilities of planktonic and adherent *Candida albicans* to antifungal agents: a modified XTT tetrazolium assay using synchronised *C. albicans* cells; *Journal of Medical and Veterinary Mycology* 1996; 34:149-152.
24. O'Toole G, Kaplan H B, Kolter R - Biofilm formation as microbial development - *Annual Reviews of Microbiology* 2000; 54:49-60.
25. Ramage G, Vande Walle K, Wickes B L *et al.* - Standardized method for in vitro antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2001; 45:2475-2479.
26. Ramage G, Tomsett K, Wickes B L *et al.* - Denture stomatitis: a role for *Candida* biofilms. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics* 2004; 98:53-59.

27. Sbarbati A, Fanos V, Bernardi P *et al.* - Rapid diagnosis of fungal infection of intravascular catheters in newborns by scanning electron microscopy; *Scanning* **2001**; 23:376-378.
28. Schinabeck M K, Long L A, Hossain M A *et al.* - Rabbit model of *Candida albicans* biofilm infection: liposomal amphotericin B antifungal lock therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2004**; 48:1727-1732.
29. O'Toole G A, Kaplans H B, Kolter R – Biofilm formation as microbial development; *Annual Reviews of Microbiology* **2002**; 54: 69- 79.
30. Van Loosdrecht M C M, Eikelbook D, Gjaltema A *et al.* - Biofilm structure, *Water Science and Technology* **1995**; 32:35-39.
31. Purevdorj – Gage L B, Stoodley P. *Biofilm structure, behaviour, and hydrodynamics*; In: Ghannoum M, O'Toole G A (eds.). *Microbial biofilms*; Washington: ASM Press, 2004:160-162.
32. Chaffin W L, Lopez-Ribot J L, Casanova M *et al.* - Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **1998**; 62:130-180.
33. Li X, Yan Z, Xu J. - Quantitative variation of biofilms among strains in natural populations of *Candida albicans*; *Microbiology* **2003**; 149:353-362.
34. Kumamoto C A - *Candida* biofilms. *Current Opinions in Microbiology* **2002**; 5:608-611.
35. Green C B, Cheng G, Chandra J *et al.* - RT-PCR detection of *Candida albicans* ALS gene expression in the reconstituted human epithelium (RHE) model of oral candidiasis and in model biofilms; *Microbiology* **2004**; 150:267-275.
36. Li F, Palecek S P - *EAPI*, a *Candida albicans* gene involved in binding human epithelial cells. *Eukaryotic Cell* **2003**; 2:1266-1273.
37. Cannon R D, Chaffin W L - Oral colonization by *Candida albicans*; *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* **1999**; 10:359-383.
38. Holmes A R, Cannon R D, Jenkinson H F - Interactions of *Candida albicans* with bacteria and salivary molecules in oral biofilms; *Journal of Industrial Microbiology* **1995**; 15:208-213.
39. Millsap K W, Bos R, Mei H C van der, Busscher H J - Adhesion and surface-aggregation of *Candida albicans* from saliva on acrylic surfaces with adhering bacteria as studied in a parallel plate flow chamber; *Antonie van Leeuwenhoek* **1999**; 75:351-359.
40. Millsap K W, Bos R, van der Mei H C, Busscher H J - Adhesion and surface-aggregation of *Candida albicans* from saliva on acrylic surfaces with adhering bacteria as studied in a parallel plate flow chamber. *Antonie van Leeuwenhoek* **1999**; 75:337-343.
41. Chandra J, Mukherjee P K, Leidich S D *et al.* - Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic in vitro. *Journal of Dental Research* **2001**; 80:903-908.
42. Hawser S P, Baillie G H, Douglas L J - Production of extracellular matrix by *Candida albicans* biofilms. *Journal of Medical Microbiology* **1998**; 47:253-256.
43. Hawser S P, Douglas L J - Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials in vitro; *Infection and Immunity* **1994**; 62:915-921.
44. Kuhn D M, Chandra J, Mukherjee P K *et al.* - Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. *Infection and Immunity* **2002**; 70:878-888.
45. Ramage G, Vande Walle K, Wickes B L *et al.* - Biofilm formation by *Candida dubliniensis*; *Journal of Clinical Microbiology* **2001**; 39:3234-3240.
46. Ramage G, VandeWalle K, Wickes B L *et al.* - Characteristics of biofilm formation by *Candida albicans*; *Revista Iberoamericana de Micologia* **2001**; 18:163-170.
47. Jin Y, Samaranayake Y H, Yip H K, Samaranayake L P – Characterization of switch phenotypes in *Candida albicans* biofilms; *Mycopathologia* **2005**; 160:191-200.
48. Gow N A, Brown A J, Odds F C - Fungal morphogenesis and host invasion. *Current Opinions in Microbiology* **2002**; 5:366-371.
49. Gristina A G, Shibata Y, Giridhar G *et al.* - The glycocalyx, biofilm, microbes, and resistant infection. *Seminar in Arthroplasty* **1994**; 5:160-170.
50. Espinel – Ingroff A F, Barchiesi F, Hazen K C, Martinez – Suarez J V *et al.* - Standardization of antifungal susceptibility testing and clinical relevance; *Medical Mycology* **1998**; 36:68-78.
51. Ghannoum M A – Susceptibility testing of fungi and correlation with clinical outcome; *Journal of Chemotherapy* **1997**; 9:19-24.
52. Gristina A G, Hobgood C D, Webb L X, Myrvik Q N – Adhesive colonization of biomaterials and antibiotic resistance; *Biomaterials* **1987**; 8:423-426.
53. Baillie G S, Douglas L J – *Candida* biofilms and their susceptibility to antifungal agents; *Methods in Enzymology* **1999**; 310:644-656.
54. Baillie G S, Douglas L J – Iron - limited biofilms of *Candida albicans* and their susceptibility to amphotericin B; *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1998**; 42:2146-2149.
55. Baillie G S, Douglas L J – Effect of growth rate on resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents; *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1998**; 42:1900-1905.

56. Kuhn D M – Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces; ***Infection and Immunity* 2002** ; 70:878-888.
57. Shin J H – Biofilm production by isolates of *Candida* species recovered from non-neutropenic patients: comparison of blood-stream isolates with isolates from other sources; ***Journal of Clinical Microbiology* 2002**; 40:1244-1248.
58. Nikawa H – The role of saliva and serum in *Candida albicans* biofilm formation on denture acrylic surfaces; ***Microbial Ecology in Health and Disease* 1996**; 9:35-48.
59. Chandra J – Antifungal resistance of *Candida* biofilms formed on denture acrylic *in vitro*; ***Journal of Dental Research* 2001**; 80:903-908.
60. Odds F C. ***Candida and Candidosis. A review of bibliography***; 2nd edn; Philadelphia: Bailliere Tindall; 1988
61. Kullberg B J, Filler S G. ***Candidemia***. In: Calderone R (ed). *Candida and Candidiasis*; Washington: ASM Press, 2002:327-340.
62. Chandra J – Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance; ***Journal of Bacteriology* 2001**; 183:5385-5394.
63. Lamfon H, Porter S R, McCullough M, Pratten J – Susceptibility of *Candida albicans* biofilms grown in a constant depth film fermenter to chlorhexidine, fluconazole and miconazole: a longitudinal study; ***Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2004**; 53:383-385.
64. Lewis R E, Kontoyiannis D P, Darouiche R O, Raad I I *et al.* - Antifungal activity of amphotericin B, fluconazole, and voriconazole in an *in vitro* model of *Candida* catheter-related bloodstream infection; ***Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2002**; 46:3499-3505.
65. Ramage B, Wickes B L, Lopez-Ribot J L – Biofilms of *Candida albicans* and their associated resistance to antifungal agents. ***American Clinical Laboratory* 2001**; 20:42-44.
66. Hawser S P, Norris H, Jessup C J, Ghannoum M A – Comparison of a 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino)carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide (XTT) colorimetric method with the standardized National Committee for Clinical Laboratory Standard method of testing clinical yeast isolates for susceptibility to antifungal agents; ***Journal of Clinical Microbiology* 1998**; 1450-1452.
67. Tellier R, Krajden M, Grigoriew G A, Campbell I – Innovative endpoint determination system for antifungal susceptibility testing of yeasts. ***Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1992**; 36:1619-1625.
68. Jabra-Rizk M A, Falkler W A, Meiller T F – Fungal biofilms and drug resistance; ***Emerging Infectious Diseases* 2004**; 10:14-19.
69. Del Sorbo G, Schoonbeek H, De Waard M A – Fungal transporters involved in efflux of natural toxic compounds and fungicides; ***Fungal Genetics and Biology* 2000**; 30:1-15.
70. Budtz-Jorgensen E. ***Candida associated denture stomatitis and angular cheilitis***. In: Samaranayake L P, MacFarlane T W (eds). *Oral candidosis*; Bristol: Wright, 1990:156-183.
71. Radfort D R, Radfort J R – A SEM study of denture plaque and oral mucosa of denture – related stomatitis; ***Journal of Dentistry* 1993**; 21:87-93.
72. Ramage G, Bachmann S, Patterson T F, Lopez-Ribot J L – Investigation of multidrug efflux pumps in relation to fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms; ***Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2002**; 49:973-980.
73. White L S, Marr K A, Bowden R A – Clinical, cellular and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance; ***Clinical Microbiology Reviews* 1998**; 11:382-402.