

Rezistența biofilmelor de *Candida* la antifungice

IOANA COLOȘI*, CARMEN COSTACHE, MONICA JUNIE

Universitatea de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca, Catedra de Microbiologie

Primit (Received): 1.03.2009/Acceptat (Accepted): 10.04.2009

The resistance of *Candida* biofilms to antifungal drugs

Abstract: The fungi of the genus *Candida* are endogenous commensals of the gastrointestinal tract, vagina and skin in healthy individuals. In certain circumstances, however, they can cause a wide range of diseases, from mucosal candidiasis to severe, disseminated infections. The increased incidence of *Candida* infections in the last decades was linked to the increased use of medical implant devices, especially in patients with impaired host defenses. One of the main virulence factors of *Candida* is its ability to produce surface attached microbial communities, known as biofilms. The biofilms are defined as microbial communities encased in a matrix of extracellular polymeric substances (EPS) and displaying phenotypic features that differ from their planktonic or free-floating counterparts. The clinical consequences of *Candida* biofilm formation on medical devices are very important because of their increased resistance to most antifungal drugs (except echinocandins and liposomal formulations of amphotericin B). They also represent a reservoir and source for future continuing infections, and can cause the failure and need for the replacement of medical devices. The mechanisms of *Candida* biofilm resistance are complex, multifactorial and not completely explained. Several explaining factors have been proposed for the increased antifungal resistance of *Candida* biofilms, such as: altered growth, metabolic rate of biofilm cells, presence of extracellular matrix, expression of resistance genes, changes in sterol composition, presence of persister cells (a subpopulation of highly antifungal tolerant cells), and mixed species biofilm.

Keywords: *Candida*, biofilm, resistance, antifungal drugs

Rezumat: Fungii aparținând genului *Candida* sunt levuri ubicuitare, la om fiind membri ai florei normale de la nivelul tractului gastrointestinal, vaginului, pielii. În anumite circumstanțe, ei pot determina infecții (candidoze), constând fie în afectări superficiale, ale pielii sau mucoaselor, fie în procese patologice severe, sistemice.

Creșterea frecvenței infecțiilor cu *Candida* în ultimele decenii a fost influențată de utilizarea pe scară largă a diverselor tipuri de dispozitive medicale (catetere, sonde, proteze, stenturi etc.), mai ales la pacienți cu deficiențe ale sistemului imun. Unul din principalii factori de virulență ai fungilor din genul *Candida* este capacitatea lor de a forma biofilme pe suprafața diferitelor dispozitive implantate. Biofilmele sunt structuri tridimensionale compuse din levuri și hife, fixate într-o matrice extracelulară care acționează ca o barieră împotriva efectorilor imunitari și antifungicelor.

Formarea biofilmelor are o importanță clinică deosebită, deoarece s-a dovedit că aceste structuri prezintă rezistență la majoritatea antifungicelor (cu excepția formei lipidice a amfotericinei B și a echinocandinelor), sunt o sursă de infecție și importantă cauză de eșec terapeutic, determinând necesitatea înlocuirii dispozitivului implantat. Rezistența biofilmelor de *Candida* la antifungice este un fenomen complex și multifactorial, încă incomplet elucidat. Între factorii posibil implicați se numără rata diferită de creștere a subpopulațiilor de celule prezente în biofilm, matricea extracelulară, expresia la nivelul celulelor din biofilm a genelor care codifică pompele de eflux, reducerea nivelului sterolilor în etapele intermediare și de maturare a biofilmelor, prezența unor celule persisteri (o subpopulație de celule cu o rezistență crescută la antifungice), biofilmele mixte, bacteriene și fungice.

Cuvinte cheie: *Candida*, biofilm, rezistență, antifungice

Introducere

Fungii din genul *Candida* sunt levuri ubicuitare, la om fiind membri ai florei normale de la nivelul tractului gastrointestinal, vaginului, pielii. Ca și oportuniști pot să determine diferite infecții

(candidoze), de la infecții superficiale ale pielii sau mucoaselor până la infecții severe, sistemice, mai ales la pacienții imunodeprimați (1).

Speciile de *Candida* sunt de asemenea recunoscute ca agenți etiologici ai infecțiilor

* Ioana Coloși,
Str. Donath XV/26, Cluj-Napoca, 400288, Romania
Tel: 0749-067874; E-mail: ioana.colosi@gmail.com

nosocomiale, situându-se pe locul 4 în USA ca și cauză de septicemii (bloodstream infections) după stafilococii coagulazo-negativi, *Staphylococcus aureus* și enterococi (2, 3, 4, 5). Levurile, mai ales *Candida albicans*, se situează între primele locuri privind cauzele infecțiilor cu punct de plecare la nivelul unor catetere, în aceste cazuri rata mortalității printre pacienții cu candidoze ajungând la un nivel ridicat, în ciuda tratamentului (6, 7, 8, 9).

Dintre speciile de *Candida* izolate din diferite infecții, pe lângă *C. albicans*, care se menține pe primul loc (10, 11), s-au izolat și *Candida krusei*, *Candida glabrata*, *Candida lusitanae* (12), *Candida parapsilosis* (13) (mai ales în secțiile de neonatologie, asociată cu utilizarea cateterelor venoase centrale și nutriția parenterală), *Candida tropicalis* (1, 14) (pacienți oncologici, pacienți spitalizați, infecții urinare la pacienți spitalizați), precum și alte specii emergente de *Candida*: *Candida dubliniensis* (12, 15).

Factorii favorizanți ai infecțiilor cu *Candida*

Factorii favorizanți ai infecțiilor cu *Candida* includ: terapia imunosupresoare, tratamentul cu antibiotice, infecția cu HIV, transplantele, diabetul, vârsta înaintată, spitalizarea de lungă durată în secțiile de terapie intensivă (16). Utilizarea diverselor dispozitive medicale (catetere, sonde, diverse dispozitive protetice intracardiace, proteze articulare etc.) este unul dintre factorii care au determinat creșterea infecțiilor cu *Candida* în ultimele decenii (17, 18, 19, 20). Biodispozitivele: proteze (articulare, valve cardiace, de voce), implanturile (lentile de contact, dentare), șunturile, stenturile, tuburile endotraheale, pace-makerele, diversele tipuri de catetere permit colonizarea și formarea de biofilme de *Candida* pe suprafața lor. Se presupune că un procent ridicat (până la 65%) din infecțiile microbiene s-ar datora biofilmelor (21). Biofilmele de *Candida* sunt implicate nu numai în infecțiile cu punct de plecare dispozitive biomedicale implantate: endocardita cu *Candida* poate apărea la pacienți cu afecțiuni cardiace preexistente ca urmare a formării biofilmului pe endoteliul valvular distrus (19).

Definiție: Biofilmele sunt comunități microbiene compuse din levuri și hife alcătuind o rețea tridimensională atașată de o suprafață, fixate într-o matrice extracelulară, care acționează ca o barieră împotriva anticorpilor și antifungicelor (22, 23). Celulele din alcătuirea biofilmului (sesile) prezintă caracteristici distincte fenotipice și

genotipice față de celulele microbiene care nu sunt atașate de o suprafață (planctonice)

Importanța clinică deosebită a biofilmelor este dată de faptul că ele prezintă o rezistență crescută la majoritatea antifungicelor, sunt o continuă sursă de infecție și importantă cauză de eșec terapeutic determinând înlocuirea dispozitivului implantat, ceea ce nu este totdeauna ușor de realizat (24).

Etapele dezvoltării biofilmelor de *Candida*

Producerea biofilmului de *C. albicans* a fost descris ca un proces treptat, care începe cu aderarea la un substrat (țesutul gazdei sau un dispozitiv biomedical), urmat de proliferarea celulelor levurice pe întreaga suprafață a substratului și începerea dezvoltării hifelor (2, 16). Biofilmele de *C. albicans* se dezvoltă în 3 faze: faza incipientă (0 → 11 h) în care are loc adeziunea celulelor fungice de substrat; faza intermediară (12 h → 30 h) în timpul căreia blastosporii coagregă, proliferază formând comunități și produc o matrice extracelulară bogată în carbohidrați; faza de maturare (31 h → 72 h), în care celulele fungice sunt complet înglobate în matricea extracelulară foarte groasă (25). În etapa finală, de maturare a biofilmului, creșterea sub formă de levuri pare regresată, creșterea sub formă de hife este accentuată, iar matricea extracelulară îmbracă biofilmul (26).

Astfel, biofilmele mature (48 h) de *C. albicans* sunt o rețea densă de levuri, hife și pseudohife (27). Această rețea de levuri, hife și pseudohife nu este observată când *Candida* crește in vitro, pe medii lichide de cultură sau pe medii solide, ceea ce sugerează că morfogeneza biofilmului este declanșată de contactul candidiei cu suprafața substratului, iar stratul bazal de celule poate avea un rol important în ancorarea biofilmului de suprafață (2, 16, 20).

La nivelul biofilmului interacțiunile celulă fungică-substrat, interacțiunile dintre celulele fungice din interiorul biofilmului, producerea de hife și a matricei extracelulare reprezintă etape cheie în dezvoltarea biofilmului (26).

Deși bacteriile și majoritatea fungilor există ca celule izolate, ele sunt capabile să-și coordoneze activitățile prin secreția de factori de semnalizare și să răspundă la aceste semnale. „Quorum sensing” descrie un set larg de fenomene în care răspunsurile sunt dependente de densitatea celulară și controlate prin semnale moleculare. Comunicarea intercelulară este deosebit de importantă în dezvoltarea

biofilmelor microbiene: previne suprapopularea din interiorul biofilmului, controlează competiția pentru nutrienți, joacă un rol important în diseminarea și producerea de noi focare infecțioase la distanță (26, 28).

Implicațiile clinice ale formării biofilmelor de *Candida*

Dezvoltarea biofilmelor de *Candida* are implicații clinice importante datorită rezistenței crescute la antifungice și protecția împotriva apărării gazdei (12). Prima raportare de rezistență a biofilmelor de *Candida* la antifungice a fost realizată în 1995 (29). De atunci biofilmele de *Candida* au fost intens studiate pentru a se găsi cauzele acestei rezistențe crescute la antifungice, care are importante implicații terapeutice (30).

Studierea biofilmelor de *Candida* s-a realizat prin utilizarea diverselor modele in vitro: modele dentare, catetere (25). Astfel s-a demonstrat că biofilmele de *C. albicans* au o rezistență crescută la acțiunea Amfotericinei B, Clorheximidei, Nistatinului, Fluconazolului (16, 31, 32, 33). Pentru o mai bună înțelegere a fenomenelor care au loc in vivo au fost dezvoltate și modele animale, studiindu-se infecțiile de cateter cu *Candida* **Error! Bookmark not defined.** Diverse grupuri de cercetători au descris că biofilmele de *Candida* pot prezenta o rezistență de până la 4000x mai mare la Fluconazol decât celulele planctonice (29, 31, 34, 35, 36, 37).

Mecanismele de rezistență a biofilmelor de *Candida* la antifungice

Rezistența biofilmelor de *Candida* la antifungice este un fenomen complex și multifactorial, încă incomplet elucidat (30). Dintre factorii care se presupune că sunt implicați se numără:

- matricea extracelulară
- rata diferită de creștere a subpopulațiilor de celule prezente în biofilm
- expresia la nivelul celulelor din biofilm a genelor care codifică pompe de eflux
- reducerea nivelului sterolilor în etapele intermediare și de maturare a biofilmelor
- prezența unor celule numite „persisteri” (o subpopulație de celule cu o rezistență crescută la antifungice)
- existența biofilmelor mixte, compuse din bacterii și fungi.

Matricea extracelulară

Matricea extracelulară este produsă de celulele sesile din biofilm pe care le înconjoară. S-a presupus că ar putea acționa ca o barieră, împiedicând difuzia antibioticelor/antifungicelor și/sau ar putea acționa ca o rășină schimbătoare de ioni, legând moleculele încărcate de antibiotice (28, 38). În biofilmele mixte, bacteriene și fungice, matricea extracelulară produsă de bacterii întârzie difuziunea antifungicelor, dar nu are un rol determinant în rezistența biofilmelor de *Candida* la antifungice (39, 40). S-a presupus o perioadă lungă de timp că matricea extracelulară polimerică poate exclude sau limita accesul antifungicelor la microorganismele din profunzimea biofilmului (2). Diverse studii au demonstrat că rezistența la antifungice nu depinde doar de mărimea matricei formate (35). Astfel, deși din punct de vedere structural biofilmele de *C. parapsilosis* sunt mai puțin complexe și au o matrice extracelulară în cantitate mai redusă decât *C. albicans* sunt și ele la fel de rezistente la acțiunea antifungicelor ca și biofilmele de *C. albicans* (32).

Rezistența la antifungice ar putea fi influențată nu doar de grosimea biofilmelor ci și de compoziția lor. Biofilmul de *C. tropicalis*, caracterizat printr-o concentrație mai crescută în hexozamină decât cel produs de *C. albicans*, este slab penetrat de antifungice și este mai rezistent la acțiunea antifungicelor decât cel produs de *C. albicans* (41). Toate aceste studii demonstrează că matricea extracelulară nu este singura răspunzătoare de rezistența la antifungice a tulpinilor de *Candida*.

Rata diferită de creștere a subpopulațiilor de celule prezente în biofilm

Alt fenomen implicat în rezistența biofilmelor de *Candida* la antifungice este rata diferită de creștere a subpopulațiilor de celule prezente în biofilm. În interiorul biofilmului este un mediu modificat, ceea ce determină existența de zone de creștere lentă și zone fără creștere (40). Celulele din biofilm se presupune că se dezvoltă mai greu datorită cantității scăzute de nutrienți, mai ales la baza biofilmelor (2). O încetinire în ritmul de creștere este frecvent acompaniată de modificări în structura de suprafață a celulelor de *Candida*, ceea ce le-ar putea afecta sensibilitatea la antifungice (19, 42). Diverse experimente au demonstrat că biofilmele sunt rezistente la antifungice indiferent de rata de creștere, pe când celulele planctonice de *Candida* au fost rezistente la antifungice doar la rate scăzute de creștere (34). De asemenea s-a

demonstrat ca biofilmul matur este rezistent la Amfotericina B, indiferent de rata de creștere și nivelul nutrienților (28, 34). Progresia rezistenței la antifungice a fost asociată cu creșterea activității metabolice pe măsura dezvoltării biofilmului => rezistența la antifungice se dezvoltă treptat, în paralel cu dezvoltarea biofilmului (16).

Expresia la nivelul celulelor din biofilm a unor gene care codifică pompe de eflux

Celulele fungice din alcătuirea biofilmului (sesile) prezintă caracteristici genotipice distincte față de celulele care nu sunt atașate de o suprafață (planctonice). Astfel s-a presupus că expresia unor gene diferite față de celulele planctonice de *Candida* au rol în rezistența la antifungice a biofilmelor. Activarea genelor care codifică pompe de eflux în faza timpurie de dezvoltare a biofilmului poate determina apariția de fenotipuri multiplu rezistente la azoli (2, 12). Rezistența biofilmelor de *C. albicans* la Fluconazol a fost demonstrată prin creșterea efluxului de antifungic, mediat mai ales de ATP-binding – cassette (ABC) și de transportori din superfamilia de facilitatori majori (major facilitator superfamily transporters -MFS) (17, 43, 44, 45, 46). ABC transporter –la *C. albicans* constituie o familie multigenică și include câteva gene CDR (Candida drug resistance), cu un rol demonstrat în rezistența la azoli. Mai multe antifungice pot fi substrat pentru acești transporteri, supraexpresia genelor care codifică transporterii ar putea explica rezistența încrucișată între diferite antifungice.

Dintre MSF: genele MDR1 (multidrug resistance) codifică un facilitator major care ar putea fi implicat în rezistența *C. albicans* la azoli și supraexpresia acestora determină rezistența exclusivă la Fluconazol (47, 48).

Pompele de eflux contribuie la rezistența la azoli doar în faza incipientă de formare a biofilmului de *C. albicans*, dar nu intervin în fazele tardive (25). Implicarea acestor gene în rezistența la Fluconazol a fost demonstrată și prin faptul ca mutații în genele MDR1 și CDR1 scad rezistența biofilmelor la Fluconazol și o dublă mutație în genele care codifică pompele de eflux anulează rezistența biofilmelor de *Candida* (în faza incipientă de dezvoltare) la Fluconazol (26).

Modificarea compoziției în steroli

Modificarea compoziției în steroli este implicată în rezistența la azoli în fazele intermediară și de maturare a biofilmului. Diferențele în concentrația sterolilor este mai pronunțată la 12 h și

48 h (faza intermediară și respectiv de maturare a biofilmului), faze în care pompele de eflux nu par să mai joace un rol în rezistența la azoli (25).

Alterarea compoziției în steroli a fost legată de rezistența la azoli și a celulelor planctonice de *Candida* (28). Peretele celular al celulelor sesile de *C. albicans* conține o cantitate mai crescută de carbohidrați și β -1,3 glucan comparativ cu celulele planctonice. Modificările din structura peretelui celular al *C. albicans* din biofilm, mai ales în ce privește cantitatea de β -1,3 glucan, poate contribui la rezistența biofilmului de *C. albicans* la antifungice. Ipoteza care se impune este că glucanul poate interacționa cu antifungicul și inhibă penetrarea acestuia la locul de acțiune (49).

Prezența persisterilor la nivelul biofilmelor

S-a demonstrat existența la nivelul biofilmelor de *Candida* a unor celule persisteri, care sunt protejate împotriva agresiunilor medicamentoase (40). O ipoteză propusă pentru biofilmele bacteriene este aceea conform căreia nu este necesar ca majoritatea celulelor din biofilm să fie mai rezistente la acțiunea agenților antibacterieni decât celulele bacteriene planctonice (12). Câteva celule bacteriene pot supraviețui (persisteri) și sunt protejate de acțiunea antibioticelor care le încetinesc creșterea, în mod paradoxal ajutând acești persisteri să reziste la distrugere. Acești persisteri sunt responsabili de nivelul înalt de rezistență al biofilmelor la acțiunea antibioticelor (33, 36, 50). Sub acțiunea antifungicelor biofilmele de *C. albicans* exprimă un pattern bifazic de distrugere, majoritatea celulelor fiind sensibile la antifungice și o mică subpopulație, 10^{-2} - 10^{-3} celule sunt înalt rezistente la antifungice (51).

Biofilmele mixte, formate din bacterii și fungi

In vivo, în biofilmele de *Candida* sunt frecvent prezente și bacterii. Se presupune că între bacterii și *Candida* au loc diverse interacțiuni: celulele fungice pot modula acțiunea antibioticelor și bacteriile pot afecta acțiunea antifungicelor la nivelul biofilmelor (2, 28). S-a observat că rezistența *Candida* la Fluconazol a fost accentuată de prezența stafilococilor producători de slime, dar nu a fost afectată de prezența stafilococilor slime negativi (39). *Pseudomonas aeruginosa* formează un biofilm dens în jurul filamentelor de *C. albicans* pe care le distruge, dar levurile de *Candida* nu sunt distruse (52). Celulele de *C. albicans* sunt capabile

să-și inhibe procesul de filamentare ca răspuns la moleculele de quorum-sensing eliberate de *P. aeruginosa* (53). Aceste experimente și observații demonstrează că morfologia biofilmelor de *Candida* se află sub controlul condițiilor de mediu.

Există studii care au investigat penetrarea antifungicelor prin biofilmele produse de o singură specie, respectiv biofilmele produse de mai multe specii de *Candida*. Fluconazolul penetrează biofilmele produse de o singură specie de *Candida* mai rapid decât Flucitozina. Difuzia antifungicelor prin biofilmele produse de *C. glabrata* și *C. krusei* a fost mai rapidă decât prin biofilmele produse de *C. parapsilosis*, respectiv *C. tropicalis* (40).

Metoda diluțiilor pentru testarea sensibilității la antifungice a *Candida* (CLSI) utilizează celule planctonice și nu oferă informații asupra sensibilității la antifungice a biofilmelor => poate fi unul din motivele de discordanță dintre rezultatele antifungigramei efectuate conform CLSI și rezultatele clinice (28, 54, 55). În prezent există un model in vitro pentru determinarea sensibilității biofilmelor de *Candida* la antifungice (36).

Eficacitatea diverselor antifungice asupra biofilmelor de *Candida*

Kuhn et al în 2002 au demonstrat că biofilmele de *C. albicans* și *C. parapsilosis* sunt rezistente la Fluconazol, Amfotericina B, Nistatin, Clorhexidina, Terbinafina. De asemenea sunt rezistente și la acțiunea Voriconazolului și Ravuconazolului, chiar dacă atât tulpinile de *C. albicans* cât și cele de *C. parapsilosis* sub formă planctonică au fost sensibile la aceste antifungice. În schimb complexul lipidic Amfotericină B și forma liposomală a Amfotericinei B au o activitate inhibitorie asupra biofilmelor de *C. albicans* la valori ale CMI similare cu cele observate pentru celulele de *C. albicans* planctonice. Biofilmele de *C. parapsilosis* au fost sensibile la acțiunea formei lipidice a Amfotericinei B dar la concentrații mai mari decât cele necesare pentru formele planctonice. De asemenea este prima raportare că Micafungina și Caspofungina sunt active împotriva biofilmelor de *C. albicans* și *C. parapsilosis*. Echinocandinele inhibă producerea de 1,3 β -D glucan, care este un component fundamental al peretelui celular al fungilor (33). S-a demonstrat că echinocandinele afectează cinetica matricei extracelulare și că inhibarea producției de polizaharide poate determina liza și distrugerea acestora (12).

S-a demonstrat experimental că expunerea celulelor planctonice de *C. albicans* și *C. parapsilosis* la concentrații subinhibitorii de antifungice a determinat o scădere marcată a capacității levurilor de a forma biofilme, ceea ce ar putea avea rol în profilaxia infecțiilor fungice de cateter/bioproteze. Nivelele locale (nonsistemice) scăzute de antifungice ar putea fi suficiente pentru inhibiția/perturbarea biofilmelor (50).

Într-un experiment realizat de Bruzual et al în 2007 Fluconazolul a fost introdus la începutul experimentului, înainte să se formeze biofilmul de *Candida* și s-a constatat că Fluconazolul în concentrație moderată a inhibat dezvoltarea biofilmelor de *Candida*, atât a tulpinilor sensibile la Fluconazol cât și a tulpinilor rezistente la Fluconazol. Dezvoltarea biofilmelor produse de tulpini Fluconazol-sensibile și Fluconazol-rezistente a fost inhibată de prezența Fluconazolului în concentrație moderată (care se atinge în sangele pacienților), ceea ce ar putea avea un rol în profilaxie (56).

Farnesolul a fost identificat ca și un component al culturilor microbiene cu densitate crescută, cu rol în inhibarea formării hifelor. Studii au arătat că farnesolul controlează expresia unor gene importante pentru dezvoltarea hifelor, rezistența la antifungice și integritatea peretelui celular. De asemenea s-a demonstrat că Farnesolul acționează ca o moleculă care inhibă filamentarea *C. albicans*: preincubarea *C. albicans* cu concentrații crescute de farnesol inhibă aproape în totalitate formarea biofilmelor (57).

Concluzii

Rezistența la antifungice a biofilmelor de *Candida* este un fenomen complex, multifactorial, care încă nu este pe deplin explicat. Capacitatea de a forma biofilme (mai ales la suprafața unor bioproteze) a tulpinilor de *Candida* este strâns legată de capacitatea de a produce infecții și reprezintă un important factor de virulență. Printre importanța clinică a formării de biofilme se numără rezistența crescută la acțiunea antifungicelor și protecția față de sistemul imun al gazdei. Rezistența biofilmelor de *Candida* la antifungice ar putea explica persistența infecțiilor în ciuda unei terapii adecvate, mai ales când este vorba de infecții cu punct de plecare dispozitive bioprotetice, sau în endocardite. În viitor este necesară investigarea utilizării unor materiale noi pentru realizarea bioprotezelor și aplicarea unor strategii preventive care să inhibe dezvoltarea biofilmelor.

Bibliografie

1. Bizerra FC, Nakamura CV, de Poersch C *et al.*- Characteristics of biofilm formation by *Candida tropicalis* and antifungal resistance; *FEMS Yeast Research* **2008**; 8: 442–450.
2. Douglas LJ- *Candida* biofilms and their role in infection; *Trends Microbiology* **2003**;11(1):30-36.
3. Seneviratne CJ, Jin L, Samaranayake LP- Biofilm lifestyle of *Candida*: a mini review; *Oral Diseases* **2008**; 14(7):582-590.
4. Banerjee SN, Emori TG, Culver DH *et al.*- Secular trends in nosocomial primary bloodstream infections in the United States, 1980-1989; National Nosocomial Infections Surveillance System; *American Journal of Medicine* **1991**; 91(3B):86S-89S.
5. Edmond MB, Wallace SE, McClish DK *et al.* - Nosocomial bloodstream infections in the United States hospitals: a three-years analysis; *Clinical Infectious Diseases* **1999**; 29(2):239-244.
6. Crump JA, Collingnon PJ- Intravascular catheter-associated infections; *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* **2000**;19(1):1-8.
7. Nguyen MH, Peacock JE Jr, Tanner DC *et al.*- Therapeutic approaches in patients with candidemia: evaluation in a multicenter prospective observational study; *Archives of Internal Medicine* **1995**;155(22):2429-2435.
8. Wenzel RP, Gennings C- Blood-stream infections due to *Candida* species in the intensive care unit: identifying especially high-risk patients to determine preventions strategies; *Clinical Infectious Diseases* **2005**; 41 Suppl 6:S389-S393.
9. Colombo AL, Nucci M, Park BJ *et al.*- Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers; *Journal of Clinical Microbiology* **2006**; 44(8):2816-2823.
10. Pfaller MA, Deikema DJ- Role of sentinel surveillance of candidemia: trends in species distribution and antifungal susceptibility; *Journal of Clinical Microbiology* **2002**; 40(10):3551-3557.
11. Tortorano AM, Prigitano A, Biraghi E, Viviani AM- The European Confederation of Medical Mycology ECMM survey of candidaemia in Italy: in vitro susceptibility of 375 of *Candida albicans* isolates and biofilm production; *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **2005**; 56:777-779.
12. Jabra-Rizk MA, Falkler WA, Meiller TF- Fungal biofilm and drug resistance; *Emerging Infectious Diseases* **2004**; 10(1):14-19.
13. Saiman L, Ludington E, Pfaller M *et al.*- Risk factors for candidemia in neonatal intensive care unit patients. The National Epidemiology of Mycosis Survey Study Group; *The Pediatric Infectious Disease Journal* **2000**;19(4):319-324.
14. Nucci M, Colombo AL- Candidemia due to *Candida tropicalis*: clinical, epidemiologic and microbiologic characteristics of 188 episodes occurring in tertiary care hospitals; *Diagnostic Microbiology Infectious Disease* **2007**;58(1):77-82.
15. Sullivan D, Coleman D- *Candida dubliniensis*: an emerging opportunistic pathogen; *Current Topics in Medical Mycology* **1997**;8(1-2):15-25.
16. Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK *et al.*- Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance; *The Journal of Bacteriology* **2001**; 183(183):5385-5394.
17. Ramage G, Bachmann S, Patterson TF *et al.*- Investigation of multidrug efflux pumps in relation to fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms; *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **2002**;49(6):973-80.
18. Ramage G, Martinez JP, Lopez-Ribot JL- *Candida* biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem; *FEMS Yeast Research* **2006**; 6(7):979-986.
19. Donlan RM, Costerton JW- Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms; *Clinical Microbiology Reviews* **2002**; 15(2):167-93.
20. Douglas LJ- Medical importance of biofilms in *Candida* infections; *Revista Iberoamericana de Micología* **2002**; 19(3):139-143.
21. Potera C- Forging a link between biofilms and disease; *Science* **1999**; 283(5409):1837-1839.
22. Costerton JW, Cheng KJ, Geesey GG *et al.*- Bacterial biofilms in nature and disease; *Annual Reviews of Microbiology* **1987**;41:435-64.
23. Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE *et al.*- Microbial biofilms; *Annual Reviews of Microbiology* **1995**; 49:711-745.
24. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP- Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections; *Science* **1999**; 284(5418): 1318-1322.
25. Mukherjee PK, Chandra J, Kuhn DM, Ghannoum MA- Mechanism of fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms: phase-specific role of efflux pumps and membrane sterols; *Infection and Immunity* **2003**;71(8):4333-4340.
26. Blankenship JR, Mitchell A- How to build a biofilm: a fungal perspective; *Current Opinion in Microbiology* **2006**; 9(6):588-594.

27. Hawser SP, Douglas LJ- Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials *in vitro*; ***Infection and Immunity* 1994**; 62(3):915-921.
28. Ramage G, Saville SP, Thomas DP, Lopez-Ribot JL- *Candida* biofilms: an update; ***Eukaryotic Cell* 2005**; 4(4):633-638.
29. Hawser SP, Douglas LJ- Resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents *in vitro*; ***Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1995**; 39(9):2128-2131.
30. Malic LI, Apetrei IC, Mares M- Biofilmele fungice: strategii de supravietuire; ***Fungi & Mycotoxins* 2007**; 1(1):7-14.
31. Chandra J, Mukherjee PK, Leidich SD *et al.*- Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic *in vitro*; ***Journal of Dental Research* 2001**;80(3):903-908.
32. Kuhn DM, Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA.- Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces; ***Infection and Immunity* 2002**;70(2):878-888.
33. Kuhn DM, George T, Chandra J *et al.*- Antifungal susceptibility of *Candida* biofilms: unique efficacy of amphotericin B lipid formulations and echinocandins; ***Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2002**; 46(6):1773-1780.
34. Baillie GS, Douglas LJ- Effect of growth rate on resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents; ***Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1998**; 42(8):1900-1905.
35. Baillie GS, Douglas LJ- Matrix polymers of *Candida* biofilms and their possible role in biofilm resistance to antifungal agents; ***Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2000**; 46(3):397-403.
36. Ramage G, Vande Walle K, Wickes BL, Lopez-Ribot JL- Standardized method for *in vitro* antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms; ***Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2001**;45(9):2475-2479.
37. Ramage G, Vandewalle K, Wickes BL, López-Ribot JL- Characteristics of biofilm formation by *Candida albicans*; ***Revista Iberoamericana de Micología* 2001**;18(4):163-170.
38. Hoyle BD, Jass J, Costerton JW- The biofilm glycocalyx as a resistance factor; ***Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 1990**; 26(1):1-5.
39. Adam B, Baillie GS, Douglas LJ- Mixed species biofilms of *Candida albicans* and *Staphylococcus epidermidis*; ***Journal of Medical Microbiology* 2002**;51(4):344-349.
40. Al-Fattani MA, Douglas LJ- Penetration of *Candida* biofilms by antifungal agents; ***Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2004**; 48(9):3291-3297.
41. Al-Fattani MA, Douglas JL- Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance; ***Journal of Medical Microbiology* 2006**; 55:999–1008.
42. Mah TF, O'Toole GA- Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents; ***Trends in Microbiology* 2001**; 9(1):34-39.
43. Albertson GD, Niimi M, Cannon RD, Jenkinson HF- Multiple efflux mechanisms are involved in *Candida albicans* fluconazole resistance; ***Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1996**; 40(12):2835-2841.
44. Lopez-Ribot JL, McAtee RK, Perea S *et al.*- Multiple resistant phenotypes of *Candida albicans* coexist during episodes of oropharyngeal candidiasis in human immunodeficiency virus-infected patients; ***Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1999**; 43(7):1621-1630.
45. Sanglard D, Ischer F, Monod M, Bille J- Cloning of *Candida albicans* genes conferring resistance to azole antifungal agents: characterization of CDR2, a new multidrug ABC transporter gene; ***Microbiology* 1997**;143:405-16.
46. White TC, Marr KA, Bowden RA- Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance; ***Clinical Microbiology Reviews* 1998**;11(2):382-402.
47. Prasad R, De Wergifosse P, Goffeau A, Balzi E- Molecular cloning and characterization of a novel gene of *Candida albicans*, CDR1, conferring multiple resistance to drugs and antifungals; ***Current Genetics* 1995**; 27(4):320-329.
48. Walsh TJ, Kasai M, Francesconi A *et al.*- New evidence that *Candida albicans* possesses additional ATP-binding cassette MDR-like genes: implications for antifungal azole resistance; ***Journal of Medical Veterinary Mycology* 1997**;35(2):133-137.
49. Nett J, Lincoln L, Marchillo K *et al.*- Putative role of β -1,3 glucans in *Candida albicans* biofilm resistance; ***Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2007**; 51(2): 510–520.
50. Lewis K- Riddle of biofilm resistance; ***Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2001**; 45(4):999-1007.
51. LaFleur MD, Kumamoto CA, Lewis K- *Candida albicans* biofilms produce antifungal-tolerant persister cells; ***Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2006**; 50(11):3839-3846.
52. Hogan DA, Kolter R- Pseudomonas-Candida interactions: an ecological role for virulence factors; ***Science* 2002**; 296:2229-2232.
53. Hogan DA, Vik A, Kolter R- A *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecule influences *Candida albicans* morphology; ***Molecular Microbiology* 2004**; 54(5):1212-1223.

54. Ghannoum MA- Susceptibility testing of fungi and correlation with clinical outcome; *Journal of Chemotherapy* **1997**; 9(S1):19-24.
55. Rex JM, Pfaller MA, Galgiani JN *et al.*- Developement of interpretive breakpoints for antifungal susceptibility testing: conceptual framework and analysis of *in vitro-in vivo* correlation data for fluconazole, itraconazole, and candida infections. Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing of the National Committee for Clinical Laboratory Standards; *Clinical Infectious Diseases* **1997**; 24(2):235-427.
56. Bruzual I, Riggle P, Hadley S, Kumamoto CA- Biofilm formation by fluconazole-resistant *Candida albicans* strains is inhibited by fluconazole; *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **2007**; 59(3):441–450.
57. Hornby JM, Jensen EC, Lisec AD *et al.*- Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol; *Applied and Environmental Microbiology* **2001**; 67(7):2982-1992.