

BARBARA DOROCKA-BOBKOWSKA<sup>1</sup>, KRYSZYNA KONOPKA<sup>2</sup>

## Powstawanie biofilmu *Candida* i jego znaczenie w patogenezie zakażeń przewlekłych – przegląd piśmiennictwa

### Biofilm Formation by *Candida* and its Role in the Pathogenesis of Chronic Infections – Review

<sup>1</sup> Zakład Protetyki Stomatologicznej IS AM w Poznaniu

<sup>2</sup> Department of Microbiology, University of the Pacific, School of Dentistry, San Francisco

#### Streszczenie

Występowanie struktur biofilmu stanowi najczęstszy rodzaj wzrostu drobnoustrojów w organizmie ludzkim. Drobnoustroje gatunku *C. albicans* są ciągle głównym czynnikiem etiologicznym w rozwoju grzybic, ale w ostatnich latach często stwierdza się zakażenia wywołane przez grzyby gatunku *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* oraz *C. dubliniensis*. Tworzenie biofilmu przez grzyby rodzaju *Candida* odgrywa istotną rolę w patogenezie zakażeń wywołanych przez te drobnoustroje. Zakażenia grzybicze mogą występować również u chorych, u których stosuje się produkty wykonane z biomateriałów (cewniki, dreny, bioprotezy zastawek, zespolenia naczyniowe, protezy stawowe i zębowe, soczewki oczne i inne). W powstawaniu struktury biofilmu wyróżniono trzy fazy: wczesną, pośrednią oraz dojrzwianą. Dojrzały biofilm *C. albicans* ma strukturę heterogenną, w której mikrokolonie komórek grzybów o określonej aktywności metabolicznej są otoczone cząsteczkami polisachrydowej substancji pozakomórkowej. Tworzenie wypustek filamentacyjnych przez blastosporę *C. albicans*, umożliwiające powstawanie mycelium, jest istotnym czynnikiem powstawania struktury dojrzałego biofilmu. Szczepki *C. albicans* pozbawione genów odpowiedzialnych za proces „filamentacji” nie syntetyzują białka EFG1 i nie są zdolne do utworzenia złożonej struktury biofilmu. Charakterystyczną cechą komórek grzybów żyjących w środowisku biofilmu jest oporność na większość obecnie stosowanych leków przeciwgrzybiczych, która wzrasta wraz z dojrzewaniem struktury biofilmu. Komórki te zachowują wrażliwość na lipidowe preparaty amfoterycyny B (liposomalna AMB i lipidowy kompleks AMB) oraz na echinokandyny (kaspofunginę i mikafunginę). Oporność grzybów na pochodne azolowe jest związana m.in. z obecnością aktywnych białek, mających właściwości pompy (drug efflux pumps). W przypadku komórek grzybów pompy te należą do dwóch klas: ABC (ATP-binding cassette) oraz MFS (major facilitator superfamily). Dalsze badanie mechanizmów biochemicznych i molekularnych procesu kolonizacji tkanek i powstawania struktury biofilmu grzybów drożdżopodobnych, ze szczególnym uwzględnieniem zjawiska oporności drobnoustrojów na leki przeciugrzybicze może stworzyć nowe możliwości w leczeniu grzybic (**Dent. Med. Probl. 2003, 40, 2, 405–410**).

**Słowa kluczowe:** biofilm, *Candida*.

#### Abstract

Biofilms are the most common mode of microbial growth in nature and are important in clinical infections, especially due to their high antibiotic resistance. In contrast to the extensive literature describing bacterial biofilms, little attention has been paid to medically relevant fungi. Fungi associated with disease belong mainly to the genus *Candida*. Although *C. albicans* is a major etiologic agent of candidiasis, other species such as *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, and *C. dubliniensis*, are isolated with increasing frequency. Predisposing factors for candidiasis include endocrine disorders, immunosuppression, antibiotic and steroid therapy, as well as use of indwelling devices (e.g. catheters, heart valves, vascular bypass grafts, artificial joints, dental prostheses, ocular lenses), which can act as substrates for biofilm growth. Biofilm formation progresses in three developmental phases: early, intermediate and maturation. The process involves the production of specific extracellular components and special cellular functions. *Candida* biofilms display an organized 3-dimensional structure and consist of a dense network of yeasts and filamentous cells deeply embedded in an extracellular polymeric matrix composed of polysac-

charides. It has been suggested that filamentation is pivotal for biofilms development. Mutants of *C. albicans* defective in the gene EFG1 are unable to filament and do not form biofilms. Fungal biofilms become highly resistant to conventional antifungal drugs and this resistance increases as the biofilm develops and matures. *Candida* biofilms are susceptible to lipid formulations of amphotericin B (AMB) (liposomal AMB and AMB lipid complex) and echinocandins (caspofungin and micafungin). The expression of genes encoding the drug efflux pumps, the ATP-binding cassette (ABC) transporters and major facilitators (CDR and MDR genes, respectively), is up-regulated during the course of biofilm formation and development. The mechanisms by which surface attachment leads to biofilm formation and contributes to increased antifungal resistance of *Candida* biofilms are yet to be determined. Better understanding of *Candida* biofilms may lead to the development of novel therapeutic approaches for the treatment of biofilm-associated fungal infections (*Dent. Med. Probl.* 2003, 40, 2, 405–410).

**Key words:** biofilm, *Candida*.

Biofilm jest utworzony przez komórki należące do jednego lub kilku gatunków drobnoustrojów, przylegających do siebie, otoczonych wytwarzaną przez nie macierzą pozakomórkową [1–4]. Uważa się, że biofilm jest heterogenną, zorganizowaną przestrzennie strukturą, składającą się z komórek i materiału pozakomórkowego. Struktura biofilmu ma rozgałęziony system kanałów, który umożliwia dostarczenie substancji odżywczych do głębiej położonych warstw komórek [5]. Wielu autorów opisuje powstawanie i cechy biofilmu bakteryjnego [3, 6, 7], stosunkowo niewiele prac dotyczy biofilmu utworzonego przez grzyby drożdżopodobne. Dane z ostatnich lat wskazują, że zakażenia grzybicze zdarzają się coraz częściej, stanowiąc istotny problem współczesnej medycyny. Dotyczy to zarówno zakażeń powierzchniowych, które obejmują błony śluzowe i skórę, jak również grzybic głębokich (grzybicze narządowe i fungemie) [8–10]. Rozpowszechnienie grzybów w mikrobiologicznym ekosystemie oraz osłabienie sił odpornościowych organizmu sprzyja rozwojowi zakażeń oportunistycznych. Grupą chorych szczególnie narażonych na ryzyko wystąpienia zakażenia grzybiczego są pacjenci ze schorzeniami nowotworowymi (ze względu na stosowanie u nich agresywnej cytotoksycznej chemioterapii lub radioterapii) oraz chorzy z zespołem nabytego upośledzenia odporności (AIDS). Rozwojowi objawowej grzybicy sprzyjają również schorzenia endokrynologiczne, szczególnie cukrzyca, przewlekła steroidoterapia i antybiotykoterapia oraz leki immunosupresyjne [8, 10–12].

Czynnikami etiologicznymi grzybic są najczęściej grzyby należące do rodzaju *Candida*, głównie gatunku *C. albicans*. W ostatnich latach notuje się jednak znaczny wzrost zakażeń spowodowanych innymi gatunkami grzybów, szczególnie często stwierdza się infekcje wywołane przez grzyby gatunku *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* oraz *C. dubliniensis* [13–16].

Tworzenie biofilmu przez grzyby rodzaju *Candida* odgrywa istotną rolę w patogenezie zakażeń wywołanych przez te drobnoustroje. Poważnym problemem są również zakażenia grzybicze

u pacjentów, u których w celach diagnostycznych lub terapeutycznych stosuje się produkty wykonane z biomateriałów (cewniki, dreny, zespolenia naczyniowe, bioprotezy zastawek, protezy stawowe i zębowe, obturatory stomatologiczne, soczewki oczne i inne). Udowodniono, że biofilm *Candida* może powstawać na powierzchni tworzyw sztucznych, takich jak polimetakrylan metylu, silikon elastomerowy, polichlorek winylu – materiałów używanych do produkcji cewników, drenów oraz protez [6, 17–19]. Zakażenie w miejscu zastosowania powyższych biomateriałów może rozwinąć się drogą endogenną (układ krążenia) lub częściej egzogenną – źródłem drobnoustrojów jest mikroflora własna skóry i błon śluzowych pacjenta lub drobnoustroje środowiska szpitalnego.

W badaniach nad biofilmem *Candida* szerokie zastosowanie znalazła metoda kolorymetryczna, określająca aktywność mitochondrialnej dehydrogenazy, enzymu będącego wskaźnikiem aktywności metabolicznej komórek grzybów. W metodzie tej aktywność metaboliczna jest oceniana na podstawie redukcji związku tetrazolowego XTT [2,3-bis(2-metoksy-4-nitro-5-sulfofenilo)-2H-tetrazolium-5-carboksyanilidu] do rozpuszczalnego w wodzie brązowego formazanu. Ilość wytworzonego produktu mierzy się spektrofotometrycznie [20]. Duże znaczenie dla określenia cech struktury biofilmu *Candida* mają badania mikroskopowe: mikroskopia fluorescencyjna, skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM) oraz skaningowa fluorescencyjna mikroskopia konfokalna, która pozwala na rekonstrukcję trójwymiarowych obrazów badanych preparatów [5, 18, 20–22].

Występowanie struktur biofilmu *Candida* w organizmie ludzkim nie wiąże się jedynie z obecnością procesów patologicznych. U zdrowego człowieka występują również biofilmy naturalne, głównie bakteryjne, które pełnią funkcje fizjologiczne, jak np. biofilm jelita grubego. W skład biofilmu naturalnego wchodzi często grzyby drożdżopodobne, które bytują w jelicie grubym lub jamie ustnej na zasadzie komensalizmu [6, 23].

## Powstawanie biofilmu *Candida*

Chandra et al. [22] opisali proces powstawania biofilmu *C. albicans* na powierzchni metakrylanu metylu oraz na powierzchni silikonu elastomerowego (tworzywa używanego do produkcji cewników). W procesie powstawania struktury biofilmu autorzy wyróżnili trzy fazy: wczesną, trwającą do 11 godzin, pośrednią (12–30 godzin) oraz dojrzewania (38–72 godzin). Podczas pierwszych 2 godzin pływające komórki planktonowe *C. albicans*, które występują najczęściej w formie drożdżowej (blastospora), osiadają na powierzchni tworzywa i przyłączają się do niej. Jest to faza adhezji. Pierwsze mikrokolonie są już widoczne po 3–4 godzinach od chwili inokulacji polimetakrylanu metylu zawieszoną *C. albicans*. W fazie pośredniej dominuje rozwój struktury pozakomórkowej (macierzy), której głównym składnikiem są polisacharydy ściany komórkowej, zawierające mannozę i reszty glikozydowe. Podczas fazy dojrzewania struktury biofilmu następuje dalszy przyrost substancji pozakomórkowej, aż do całkowitego otoczenia przez nią powstałych kolonii *Candida*. Powyższe obserwacje poczyniono hodując *C. albicans* w podłożu YNB (yeast nitrogen base medium), które sprzyja rozwojowi formy drożdżowej grzybów. *C. albicans* jest drobnoustrojem dimorficznym [21, 24]. W zależności od warunków środowiska grzyby tego gatunku mogą występować w formie drożdżowej, jako pączkujące komórki – blastospor, określane jako forma Y (od Yeasts) lub w formie micelialnej, zwanej też grzybninową, zawierającą strzępki rzekome lub prawdziwe. Ta forma jest określana jako forma M (od mycelium). W dalszych badaniach Chandra et al. [22] przeprowadzili doświadczenia, stosując podłoże RPMI 1640, sprzyjające rozwojowi formy micelialnej. Biofilm *C. albicans* powstały w tych warunkach niewiele różni się pod względem poziomu aktywności metabolicznej ani suchej biomasy od tego, który powstaje z formy drożdżowej. W konkluzji autorzy stwierdzili, że grzyby *C. albicans* zarówno w formie drożdżowej, jak i micelialnej są zdolne do tworzenia struktury biofilmu na powierzchni metakrylanu metylu. Podobne wyniki otrzymano w badaniach nad strukturą biofilmu *C. albicans* na powierzchni silikonu elastomerowego [22].

W badaniach mikroskopowych wykazano podobieństwo struktury biofilmu *C. albicans* uzyskanego na powierzchni biomateriałów w warunkach *in vitro* ze strukturą biofilmu powstałego na ścianie cewnika naczyniowego pacjenta z fungecją, co potwierdza słuszność zastosowania opisanego modelu badawczego *in vitro* w dalszych badaniach biofilmu *Candida* [22].

Baillie i Douglas [21] na podstawie badań mikroskopowych stwierdzili, że jedynie szczepy dimorficzne *C. albicans* wytwarzają biofilm złożony z dwóch warstw – podstawowej, zawierającej głównie blastospor i warstwy zewnętrznej, zawierającej strzępki lub pseudostrzępki.

Ramage et al. [25] badali, czy tworzenie mycelium przez *C. albicans* ma wpływ na powstawanie biofilmu na powierzchni polistyrenu. Szczepy *C. albicans* pozbawione genów odpowiedzialnych za proces filamentacji ( $\Delta efg1$  i  $\Delta cph1/\Delta efg1$ ) nie syntetyzują białka EFG1 i nie są zdolne do utworzenia złożonej struktury biofilmu, tworząc jedynie warstwę luźno ułożonych, wydłużonych komórek. Autorzy uważają, że tworzenie wypustek filamentacyjnych przez blastospor *C. albicans*, umożliwiające tworzenie mycelium, jest warunkiem powstawania struktury dojrzałego biofilmu. Zaskakujący jest wynik, że zarówno komórki *C. albicans* tworzące strukturę dojrzałego biofilmu, jak i komórki biofilmu wytwarzane przez mutanty pozbawione białka EFG1, wykazują zwiększoną oporność na leki przeciwgrzybicze.

Kuhn et al. [18] porównali zdolność tworzenia biofilmu na powierzchni elastomeru silikonowego przez różne gatunki grzybów rodzaju *Candida*. Posługując się testem pomiaru suchej masy biofilmu oraz badaniami mikroskopowymi wykazano, że grzyby gatunku *C. albicans* tworzą biofilm o większej masie w porównaniu z grzybami gatunku *C. parapsilosis*, *C. glabrata* i *C. tropicalis*. Aktywność metaboliczna biofilmu *C. albicans* jest znacznie wyższa niż aktywność biofilmu utworzonego przez gatunki *C. parapsilosis*, *C. glabrata* i *C. pseudotropicalis* [17]. Struktura biofilmu grzybów *C. non-albicans* jest odmienna. Tworzy go pojedyncza warstwa komórek, zawierająca nieregularne skupiska blastospor, zawieszonych w niewielkiej ilości macierzy zewnątrzkomórkowej [18]. Badania biofilmu *C. dubliniensis* na powierzchniach akrylu i polistyrenu wykazały, że struktura tego biofilmu jest podobna do struktury biofilmu *C. albicans* [19]. Obecność surowicy ułatwia powstawanie biofilmu *Candida* na powierzchni akrylu [26].

## Oporność biofilmu *Candida* na działanie leków przeciwgrzybiczych

Komórki drobnoustrojów żyjących w środowisku biofilmu różnią się fenotypowo od komórek wolno żyjących. Swoiste warunki, jakie występują w mikrośrodku biofilmu, zwłaszcza gęstość komórek w tej niszy ekologicznej oraz ich

kontakt z powierzchnią substratu, mogą brać udział w powstawaniu fenotypu charakterystycznego dla biofilmu [2, 27, 28].

Charakterystyczną cechą komórek grzybów żyjących w środowisku biofilmu jest ich oporność na większość leków przeciwgrzybiczych stosowanych obecnie [29], co powoduje komplikacje terapeutyczne. Wykazano, że komórki grzybów rosnące w populacji biofilmu na powierzchni polimetakrylanu metylu charakteryzują się zwiększoną opornością na działanie amfoterycyny B, nystatyny, flukonazolu oraz chlorheksydyny w porównaniu z komórkami tych samych drobnoustrojów, rosnących w formie planktonowej [20]. Podobne wyniki uzyskali Hawser i Douglas [30], badając oporność grzybów biofilmu *C. albicans* wobec amfoterycyny B, flucytozyny, flukonazolu, itrakonazolu oraz ketokonazolu.

Kuhn et al. [31] wykazali zwiększoną oporność *C. albicans* i *C. parapsilosis*, rosnących w populacji biofilmu w porównaniu z opornością tych drobnoustrojów w formie planktonowej. Dotyczyło to następujących leków: flukonazolu, nystatyny, chlorheksydyny, terbinafiny, amfoterycyny B oraz pochodnych azolowych – worikonazolu i rawukonazolu. Oba gatunki *Candida* rosnące w postaci biofilmu są wrażliwe na lipidowe preparaty amfoterycyny B (liposomalna AMB i lipidowy kompleks AMB) oraz na echinokandyny, kaspofunginę i mikafunginę. Wrażliwość biofilmu *C. albinans* na kaspofunginę została ostatnio potwierdzona w dwóch innych doniesieniach [32, 33]. Echinokandyny są nową grupą leków przeciwgrzybiczych, które hamują syntezę 1,3- $\beta$ -D-glukanu, głównego składnika ściany komórkowej grzybów [31]. Mechanizm ich działania na komórki biofilmu *Candida*, podobnie jak i lipidowych preparatów AMB, nie jest obecnie poznany. W wypadku tych ostatnich, sama obecność składnika lipidowego nie tłumaczy ich aktywności przeciwgrzybiczej, ponieważ biofilm *Candida* nie jest wrażliwy na lipidowy kompleks nystatyny [31].

Chandra et al. [22] badali korelację między stopniem dojrzałości biofilmu *C. albicans* a wartością minimalnych stężeń hamujących wzrost drobnoustrojów (MIC) w odniesieniu do amfoterycyny B, nystatyny, flukonazolu i chlorheksydyny. W fazie początkowej wartości MIC są niskie, wraz z dojrzewaniem biofilmu wartości te wzrastają, a w strukturze dojrzałego biofilmu komórki *C. albicans* wykazują oporność na badane leki. Wraz z dojrzewaniem biofilmu *C. albicans* wzrasta aktywność metaboliczna komórek, co zdaniem autorów wpływa na zwiększoną oporność tych drobnoustrojów na leki przeciwgrzybicze.

Ramage et al. [5] badali molekularne mechanizmy oporności planktonowych komórek *C. albi-*

*cans* na pochodne azolowe. Oporność grzybów na leki z tej grupy jest związana między innymi z obecnością aktywnych białek, mających właściwości pompy (drug efflux pumps). Białka te rozpoznają różnego typu leki i usuwają je z cytoplazmy, wykorzystując energię zawartą w ATP. W wypadku komórek grzybów pompy te należą do dwóch klas: ABC (ATP-binding cassette) oraz MFS (major facilitator superfamily). Wykazano, że mutanty *C. albicans*, niezawierające genów odpowiedzialnych za proces aktywnego usuwania leków z komórki ( $\Delta cdr1$ ,  $\Delta cdr2$ ,  $\Delta mdr1$ ,  $\Delta cdr1/\Delta cdr2$ ,  $\Delta mdr1/\Delta cdr1$ ), są zdolne do wytworzenia złożonej struktury biofilmu. Komórki planktonowe tych mutantów wykazują zwiększoną wrażliwość na flukonazol, w strukturze biofilmu natomiast są odporne na ten lek [5]. Wynika z tego, iż patomechanizm oporności biofilmu *C. albicans* na pochodne azolowe jest zjawiskiem złożonym oraz różne są mechanizmy odpowiedzialne za zjawisko oporności na leki formy planktonowej i biofilmu *C. albicans*.

Mechanizmy biologiczne, obniżające wrażliwość grzybów w populacji biofilmu na dostępne leki przeciwgrzybicze, nie zostały jak dotąd dostatecznie poznane. Na podstawie badań nad biofilmem bakteryjnym stwierdzono, iż oporność ta powstaje na skutek zmian w metabolizmie komórki bakteryjnej w populacji biofilmu w odpowiedzi na ograniczony dostęp do składników odżywczych. Istotne znaczenie może mieć również utrudniona dyfuzja leku do komórek grzybów znajdujących się w strukturze biofilmu, przez warstwę macierzy zewnątrzkomórkowej, oraz aktywacja genów odpowiedzialnych za syntezę enzymów rozkładających cząsteczki leków w osiadłych populacjach drobnoustrojów [18, 27, 34].

## Podsumowanie

Powstawanie biofilmu *Candida* na powierzchni biomateriałów zachodzi kolejno w procesie adhezji, tworzenia mikrokolonii i powstawania macierzy zewnątrzkomórkowej. Proces dojrzewania drobnoustrojów w strukturze biofilmu polega na indukcji lub supresji swoistych genów oraz zamiany cech fenotypowych komórek osiadłych w cechy charakterystyczne dla komórek populacji dojrzałego biofilmu. Badania przeprowadzone nad strukturą biofilmu *Candida* z zastosowaniem skaningowej mikroskopii konfokalnej wykazały, że struktura biofilmu na powierzchni biomateriałów zależy od gatunku tworzących go grzybów drożdżopodobnych. Dojrzały biofilm *C. albicans* ma strukturę heterogenną, w której mikrokolonie komórek grzybów o określonej aktywności metabo-



licznej są otoczone cząsteczkami polisachrydowej substancji pozakomórkowej.

Osiadłe komórki żyjące w populacji biofilmu różnią się fenotypowo od komórek wolnożyjących. Charakteryzują się znacznie większą opornością na działanie leków przeciwgrzybiczych w porównaniu do komórek planktonowych. Jest to przyczyną trudności terapeutycznych w zwalczaniu zakażeń grzybiczych, ponieważ stężenia leków niezbędne do eradykacji biofilmu *Candida* przekraczają często dostępne stężenia terapeutyczne.

Powstawanie struktury biofilmu *Candida* od-

grywa istotne znaczenie w patogenezie zakażenia grzybiczego, jednocześnie niewiele jest doniesień naukowych na ten temat. Z klinicznego punktu widzenia bardzo istotnym problemem jest oporność grzybów *Candida* w populacji biofilmu na antymikotyki. Stąd konieczne jest prowadzenie dalszych badań, zmierzających do pełnego wyjaśnienia mechanizmów biochemicznych oraz molekularnych, leżących u podstaw procesu kolonizacji tkanek i powstawania struktury biofilmu grzybów drożdżopodobnych oraz zjawiska oporności tych drobnoustrojów na leki przeciwgrzybicze.

## Piśmiennictwo

- [1] BAILLIE G. S., DOUGLAS L. J.: Matrix polymers of *Candida* biofilms and their possible role in biofilm resistance to antifungal agents. *J. Antimicrob. Chemother.* 2000, 46, 397–403.
- [2] COSTERTON J. W.: Microbial biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.* 1995, 49, 711–745.
- [3] DAVEY M. E., O'TOOLE G. A.: Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2000, 64, 847–867.
- [4] KUMAMOTO C. A.: *Candida* biofilms. *Curr. Opin. Microbiol.* 2002, 5, 608–611.
- [5] RAMAGE G., BACHMAN S., PATTERSON T. F., WICKES B. L., LÓPEZ-RIBOT J. L.: Investigation of multidrug efflux pumps in relations to fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms. *J. Antimicrobial Chemother.* 2002, 49, 973–980.
- [6] DONLAN R. M.: Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. *CID* 2001, 33, 1387–1392.
- [7] WATNICK P., KOLTER R.: Biofilm, city of microbes. *J. Bacteriol.* 2000, 182, 2675–2679.
- [8] ELLEPOLA A. N., SAMARANAYAKE L. P.: Oral candidal infections and antimycotics. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 2000, 11, 172–198.
- [9] HERMANN P., BEREK Z., NAGY G., KAMOTSAY K., ROZGONYI F.: Pathogenesis, microbiological and clinical aspects of oral candidiasis. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 2001, 48, 479–495.
- [10] SYKES L. M., SUKHA A.: Potential risk of serious oral infections in the diabetic patients: a clinical report. *J. Prosthet. Dent.* 2001, 86, 569–573.
- [11] JAUTOVA J., BALOGHOVA J., DORKO E., PILIPCINEC E., SVICKY E., DANKO J., TKACIKOVA L.: Cutaneous candidiasis in immunocompromised patients. *Folia Microbiol.* 2001, 46, 359–360.
- [12] SINGH N.: Changing spectrum of invasive candidiasis and its therapeutic implications. *Clin. Microbiol. Infect.* 2001, Suppl. 2, 1–7.
- [13] BODEY G. P., MARDANI M., HANNA H. A., BOKTOUR M., ABBAS J., GIRGAWY E., HACHEM R. Y., KONTOYIANSIS D. P., RAAD I.: The epidemiology of *Candida glabrata* and *Candida albicans* fungemia in immunocompromised patients with cancer. *Am. J. Med.* 2002, 112, 380–385.
- [14] EL-MAHALLAWY H. A., ATTIA J., ALI-EN-DIN N. H., SALEM A. E., ABO-EL-NAGA S.: A prospective study on fungal infection in children with cancer. *J. Med. Microbiol.* 2002, 51, 601–605.
- [15] FIDEL P. L., VAZQUEZ J. A., SOBEL J. D.: *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *Candida albicans*. *Clin. Microbiol. Rev.* 1999, 12, 80–96.
- [16] GUTIERREZ J., MORALES P., GONZALES M. A., QUINDOS G.: *Candida dubliniensis*, a new fungal pathogen. *J. Basic Microbiol.* 2002, 42, 207–227.
- [17] HAWSER S. P., DOUGLAS L. J.: Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials *in vitro*. *Infect. Immun.* 1994, 62, 915–21.
- [18] KUHN D. M., CHANDRA J., MUKHERJEE P. K., GHANNOUM M. A.: Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. *Infect. Immun.* 2002, 70, 878–888.
- [19] RAMAGE G., VANDE WALLE K., WICKES B. L., LÓPEZ-RIBOT J. L.: Biofilm formation by *Candida dubliniensis*. *J. Clin. Microbiol.* 2001, 39, 3234–3240.
- [20] CHANDRA J., MUKHERJEE P. K., LEIDICH, S. D., FADDOUL, F. F., HOYER L. L., Douglas L. J., Ghanoum M. A.: Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic *in vitro*. *J. Dent. Res.* 2001, 80, 903–908.
- [21] BAILLIE G. S., DOUGLAS L. J.: Role of dimorphism in the development of *Candida albicans* biofilms. *J. Med. Microbiol.* 1999, 48, 671–679.
- [22] 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. *J. Bacteriol.* 2001, 183, 5385–5394.
- [23] BURNE R. A.: Oral streptococci, products of their environment. *J. Dent. Res.* 1998, 77, 445–452.
- [24] BROWN A. J., GOW N. A. R.: Regulatory networks controlling *Candida albicans* morphogenesis. *Trends Microbiol.* 1999, 7, 333–338.

- [25] RAMAGE G., VANDE WALLE K., LÓPEZ-RIBOT J. L., WICKES, B. L.: The filamentation pathway controlled by the Efg1 regulator protein is required for normal biofilm formation and development in *Candida albicans*. FEMS Microbiol. Let. 2002, 214, 95–100.
- [26] NIKAWA H., NISHIMURA H., MAKIHIRA S., HAMADA T., SADAMORI S., SAMARANAYAKE L. P.: Effect of serum concentration on *Candida* biofilm formation on acrylic surfaces. Mycoses 2000, 43, 139–143.
- [27] MAH T. F., O'TOOLE G. A.: Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. Trends Microbiol. 2001, 9, 34–39.
- [28] RAMAGE G., VANDE WALLE K., BACHMANN S. P., WICKES B. L., LÓPEZ-RIBOT J. L.: *In vitro* pharmacodynamic properties of three antifungal agents against preformed *Candida albicans* biofilms determined by time-kill studies. Antimicrob. Agents Chemother. 2002, 46, 3634–3636.
- [29] BAILLIE G. S., DOUGLAS L. J.: *Candida* biofilms and their susceptibility to antifungal agents. Methods Enzymol. 1999, 310, 644–656.
- [30] HAWSER S., DOUGLAS J.: Resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents *in vitro*. Antimicrob. Agents Chemother. 1995, 39, 2128–2131.
- [31] KUHN D. M., GEORGE T., CHANDRA J., MUKHERJEE P. K., GHANNOUM M. A.: Antifungal susceptibility of *Candida* biofilms: unique efficacy of Amphotericin B lipid formulations and echinocandins. Antimicrob. Agents Chemother. 2002, 46, 1773–1780.
- [32] BACHMANN S. P., VANDEWALLE K., RAMAGE G., PATTERSON T. F., WICKES B. L., GRAYBILL J. R., LOPEZ-RIBOT J. L.: *In vitro* activity of caspofungin against *Candida albicans* biofilms. Antimicrob. Agents Chemother. 2002, 46, 3591–3596.
- [33] RAMAGE G., SAVILLE S. P., WICKES B. L., LÓPEZ-RIBOT J. L.: Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation by farnesol, a quorum-sensing molecule. Appl. Environ. Microbiol. 2002, 68, 5459–5463.
- [34] COQUET L., JENTER G. A., JOUENNE T.: Resistance of artificial biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* to imipenem and tobramycin. J. Antimicrob. Chemother. 1998, 42, 755–760.

### Adres do korespondencji:

Barbara Dorocka-Bobkowska  
Zakład Protetyki Stomatologicznej IS AM  
ul. Święcickiego 4  
60-781 Poznań  
tel.: (+48 61) 86 58 731  
e-mail: badb@mp.pl

Praca wpłynęła do Redakcji: 4.02.2003 r.

Po recenzji: 16.04.2003 r.

Zaakceptowano do druku: 16.04.2003 r.

Received: 4.02.2003

Revised: 16.04.2003

Accepted: 16.04.2003