

CZynniki wirulencji grzybów z rodzaju *Candida* istotne w patogenezie zakażeń występujących u pacjentów żywionych pozajelitowo

Magdalena Sikora^{1*}, Marlena Gołaś¹, Katarzyna Piskorska¹, Ewa Swoboda-Kopec¹

¹ Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Warszawski Uniwersytet Medyczny

Wpłynęło w marcu 2014 r.

1. Wstęp. 2. Czynniki ryzyka wystąpienia zakażenia o etiologii grzybiczej. 3. Czynniki wirulencji grzybów drożdżopodobnych z rodzaju *Candida*. 4. Zjawisko wzrostu w postaci biofilmu. 5. Sekrecja enzymów hydrolitycznych. 6. Zjawisko dimorfizmu. 7. Podsumowanie

Virulence factors of *Candida* species important in the pathogenesis of infections in patients with total parenteral nutrition

Abstract: Fungal infections constitute a vital clinical issue concerning various groups of patients, among them patients with total parenteral nutrition. The most common etiological infection factors, affecting the aforementioned group of patients, are among others yeastlike fungi. In clinical specimens, the predominant genus of yeastlike fungi, as isolated from the patients with total parenteral nutrition, is *Candida* spp. The species of yeastlike fungi of the *Candida* genus generate various pathogenic factors enabling invasion process and the progression of the subsequent infection stages. The most crucial of them are:

- ability to adhere and ability to form biofilms. This feature, with the mediation of adhesion proteins, enables the fungi to grow on the biomaterial surfaces, to invade the host's tissue, and conditions survival and existence in the environment;
- dimorphism. Creation of two antigenically different forms – yeast and hyphae – conditions specific escape from the immunological system of the macroorganism;
- high enzymatic activity. Hydrolytic, proteolytic and lipolytic activity, featuring primarily the adaptative function, is the indicator of the metabolic stimulation required for the infection process.

Due to the insignificant pathogenic potential of the *Candida* genus fungi, associated with the fact of their natural existence on skin and mucous membrane, the research is currently often directed at detection of the factors responsible for the colonisation and development of the fungal infections. These research attempts are aimed at differentiating between both processes.

1. Introduction. 2. Risk factors of fungal infections. 3. Virulence factors of the *Candida* genus. 4. The phenomenon of biofilm formation. 5. Hydrolytic enzymes secretion. 6. Dimorphism. 7. Conclusions

Słowa kluczowe: czynniki wirulencji, infekcje grzybicze, żywienie pozajelitowe

Key words: fungal infections, total parenteral nutrition, virulence factors

1. Wstęp

W grupach pacjentów chirurgicznych otrzymujących okołoperacyjne żywienie pozajelitowe stwierdza się więcej komplikacji infekcyjnych niż w grupach nieotrzymujących TPN (total parenteral nutrition – całkowite żywienie pozajelitowe). U tych pacjentów występuje więcej komplikacji nie infekcyjnych. Powikłania infekcyjne towarzyszące najczęściej żywieniu parenteralnemu to zapalenie płuc i bakteriemia [63]. Uogólnione infekcje odcewnikowe są powodem znacznej śmiertelności w grupach pacjentów otrzymujących TPN. Kolonizacja cewnika może również prowadzić do rozwinięcia infekcji miejscowych: septycznego, zakrzepowego zapalenia żył, wsierdza i innych infekcji ogniskowych [25].

Jako główną przyczynę infekcji pochodzenia odcewnikowego wskazywane są: gronkowce – *Staphylococcus aureus* i *Staphylococcus epidermidis*; pałeczki Gram-ujemne – *Serratia marcescens*, *Escherichia coli* i *Klebsiella pneumoniae* oraz grzyby drożdżopodobne. Według najnowszych danych infekcje odcewnikowe

mogą być spowodowane również przez inne mikroorganizmy, w tym ostatnio stwierdzone w Japonii zakażenie odcewnikowe *Bacillus cereus* [39]. Wśród izolatów grzybów drożdżopodobnych kolonizujących cewniki naczyniowe i najczęściej powodujących zakażenia, dominują gatunki *Candida albicans* [40] oraz *Candida parapsilosis* [9]. Wykazano, że ponad połowę wszystkich mikroorganizmów izolowanych z epizodów infekcji uogólnionych u osób otrzymujących długoterminowe leczenie żywieniowe stanowią bakterie Gram-dodatnie. Wśród nich dominują rodzaje *Staphylococcus* i *Enterococcus*. Bakterie Gram-ujemne to ok. 23% wszystkich izolatów. Najczęściej w materiałach klinicznych tej grupy chorych występują *K. pneumoniae* i *E. coli*. Grzyby drożdżopodobne hodowane są z 22% wszystkich materiałów. Autorzy podkreślają również, iż ok. 23% wszystkich epizodów infekcji uogólnionych posiada etiologię mieszaną [42, 43]. Obecnie obserwuje się stały wzrost zakażeń o etiologii grzybiczej. Zhao i wsp. oszacowali w swoich badaniach częstość zakażeń grzybiczych na 29% [82].

* Autor korespondencyjny: Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Warszawski Uniwersytet Medyczny, ul. Chałubińskiego 5, 02-004 Warszawa; tel. 628-37-29; e-mail: sikorka78@yahoo.com

2. Czynniki ryzyka wystąpienia zakażenia o etiologii grzybiczej

Dane literaturowe wskazują potencjalne czynniki ryzyka wystąpienia kandydozy uogólnionej, którymi są: cewnikowanie wewnętrzne (97% przypadków), antybiotykoterapia (91%), żywienie pozajelitowe (54%), przebyty zabieg operacyjny (46%), terapia immunosupresyjna (38%), guz złośliwy (27%), wcześniej przebyta grzybica (26%), transplantacja narządu (16%), neutropenia (12%) oraz wcześniejsza kolonizacja (11%) [1, 28]. Najczęściej infekcje powodowane przez grzyby z rodzaju *Candida* rozwijają się u pacjentów z neutropenią lub defektem w funkcji neutrofilów bądź makrofagów [28]. Dowiedziono, że stosowanie całkowitego żywienia pozajelitowego zwiększa ryzyko wystąpienia kandydemii 3,8-krotnie w porównaniu do pacjentów nie przechodzących infekcji. Jako czynniki ryzyka predysponujące do rozwoju wystąpienia kandydemii wymieniane są: leukopenia, przewlekła niewydolność nerek, zabieg operacyjny w obrębie jamy brzusznej, pobyt na oddziale intensywnej terapii, cewnikowanie wewnętrzne, stosowanie żywienia parenteralnego i długookresowa kortykoterapia [2]. U pacjentów z rozwiniętą kandydemią obserwowana jest podwyższona częstość kolonizacji grzybami z rodzaju *Candida* oraz występowanie wcześniejszych infekcji np. kandydurii. Stosowanie TPN zostało zakwalifikowane jako czynnik predysponujący do rozwoju kandydemii i może stać się przyczyną nawracających infekcji grzybiczych [9]. Zaobserwowano również następującą interakcję pomiędzy stosowaniem całkowitego żywienia parenteralnego, a neutropenią występującą u pacjentów. Stosowanie TPN stanowi czynnik ryzyka wystąpienia kandydemii jedynie w przypadku braku neutropenii. Natomiast sama neutropenia jest czynnikiem ryzyka jedynie przy braku TPN [30]. Drożdżaki *Candida* spp. znajdują się w chwili obecnej na czwartym miejscu wśród najczęściej spotykanych czynników etiologicznych infekcji uogólnionych; ich liczba wzrasta na oddziałach intensywnej terapii. Chow i wsp. wyodrębnili sześć niezależnych czynników predysponujących do rozwoju infekcji uogólnionych o etiologii innej niż *C. albicans* między innymi: operacja przebyta przed przyjęciem na oddział intensywnej terapii oraz stosowanie TPN. Natomiast do czynników ryzyka predysponujących do rozwoju infekcji uogólnionych o etiologii *C. albicans* zakwalifikowano między innymi operacje przeprowadzone podczas pobytu na oddziale intensywnej terapii i ponownie stosowanie TPN [12]. Według niektórych danych 80% infekcji uogólnionych o etiologii *Candida* spp., związanych z wysoką – 50% śmiertelnością, rozwija się u pacjentów przebywających na oddziałach intensywnej terapii i ambulatoryjnych cewnikowanych do żyły centralnej. Stwierdzono, że istotnym czynnikiem ryzyka u tych pacjentów jest stosowanie żywienia parenteralnego [1, 13].

2.1. *Candida* spp. jako czynnik etiologiczny infekcji

Ponad 17 gatunków z rodzaju *Candida* to czynniki etiologiczne zakażeń u ludzi [57]. Wśród nich drobnoustrojami najczęściej wywołującym infekcje jest *C. albicans*. Inne gatunki to *C. parapsilosis*, *C. glabrata* i *C. tropicalis* [57, 69]. Mogą one wywoływać zakażenia endogenne i egzogenne. Natomiast *C. krusei* nie występująca wśród flory fizjologicznej – wyłącznie egzogenne [69]. Częstość infekcji egzogennych zwiększa się wraz ze wzrostem zastosowania cewnikowania wewnątrznaczyniowego i żywienia pozajelitowego [21].

Infekcje inwazyjne powodowane przez grzyby z rodzaju *Candida* stanowią poważny problem u chorych z obniżoną odpornością. Głównymi czynnikami ryzyka są: obecność cewnika w żyłę centralnej, żywienie pozajelitowe, antybiotykoterapia, przewlekła niewydolność nerek [3, 62] oraz długi pobyt na oddziale intensywnej terapii i wcześniejsza kolonizacja błon śluzowych przez komórki grzyba z rodzaju *Candida* [62]. Barberino i wsp. w oparciu o analizę jednozmienną ustalili, że wśród 69 przypadków jedynie 14 szczepów zostało zidentyfikowane jako *C. albicans*. Inne gatunki z rodzaju *Candida* odnaleziono w 8 przypadkach: *C. tropicalis* (4 izolaty), *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. famata* (po jednym izolacie). Autorzy wskazują na stały wzrost gatunków z grupy non-*albicans* jako czynników etiologicznych fungemii. Podkreślają również, że wzrost występowania tego rodzaju infekcji notowany jest głównie na oddziałach internistycznych i chirurgicznych, nie w klinikach onkologicznych lub transplantacyjnych. Sugerują, że infekcje grzybicze przestały dotyczyć jedynie pacjentów z niesprawnie działającym układem immunologicznym [3]. Przyjmuje się, że 90% przypadków grzybiczych infekcji uogólnionych powodowanych jest przez gatunki *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* i *C. krusei*. *Candida albicans* jako czynnik infekcji uogólnionych występuje z różną częstością wahającą się od 37% w Ameryce Łacińskiej do 70% w Norwegii [42, 57, 62]. Dominacja w materiałach klinicznych gatunków *Candida* z grupy non-*albicans*: *C. glabrata* (49%), *C. tropicalis* (19%) oraz *C. parapsilosis* (18%), wskazuje najprawdopodobniej na stosowanie w leczeniu, u tych pacjentów, flukonazolu w terapii i profilaktyce [12, 43]. Obecnie notowane są również przypadki kandydemii o etiologii *Candida famata*, *C. lusitanae*, *C. krusei*, *C. dubliniensis* i innych [42].

2.1.1. *C. glabrata* i *C. krusei* – czynniki etiologiczne infekcji

Pomimo, że *Candida albicans* nadal jest dominującym gatunkiem wśród czynników etiologicznych inwazyjnej kandydozy na drugie miejsce pod względem częstości izolowanych gatunków wysuwa się *Candida glabrata*. Stanowi ona istotny odsetek wśród izolatów:

20–24% całkowitej ich liczby w Stanach Zjednoczonych, 10–14% w Europie i 4–7% w Ameryce Łacińskiej [57, 62]. Częstość izolacji tego gatunku zależy od miejsca toczącej się infekcji. W ostatnich latach izolowany jest coraz częściej z błon śluzowych jamy ustnej pojedynczo lub jako gatunek towarzyszący *C. albicans*. Stał się również częstym czynnikiem etiologicznym zakażeń układu moczowego infekcji uogólnionych [41]. Gatunek ten wykazuje zmniejszoną wrażliwość na flukonazol, jeden z najczęściej stosowanych leków przeciwgrzybiczych. Infekcje powodowane przez *C. glabrata* stanowią poważny problem terapeutyczny. Wyniki badań donoszą, że zanotowano istotny związek pomiędzy zwiększoną zachorowalnością na infekcje pochodzenia *C. glabrata*, a wzrastającym wiekiem pacjentów [57]. Drugi z gatunków niosący naturalną oporność na flukonazol – *Candida krusei*, jest obecnie coraz częściej izolowany, jakkolwiek odsetek izolatów nie osiąga liczby szczepów *C. glabrata*. Sytuacja ta jest najprawdopodobniej spowodowana powszechnym stosowaniem flukonazolu również w profilaktyce, co w konsekwencji prowadzi do selekcji gatunków naturalnie opornych [18, 30, 62]. W chwili obecnej największy odsetek infekcji uogólnionych o etiologii *C. glabrata* stwierdza się w Stanach Zjednoczonych [1].

2.1.2. *C. parapsilosis* i *C. tropicalis* – czynniki etiologiczne infekcji

Wśród patogenów grzybiczych izolowanych z przypadków fungemii odcewnikowych notowany jest stały wzrost wyhodowań *C. parapsilosis*, *C. glabrata* i *C. tropicalis*. Fungemie o etiologii *C. albicans* stanowią jedynie ok. 1/5 przypadków [43].

Fungemie powodowane przez gatunki *C. parapsilosis* i *C. tropicalis* dominują w szpitalach w Europie, Kanadzie i Ameryce Łacińskiej [1, 29]. Przyjmuje się, iż ok. 38% zakażeń *C. parapsilosis* stanowi przypadki pozaszpitalne, związane ze stosowaniem cewników wewnątrzżylnych i żywienia pozajelitowego [57]. Gatunek ten dominuje wśród izolatów wyhodowanych ze środowiska cewnika. Jako przyczynę wysokiej częstości jego izolacji autorzy podają zdolność do wytwarzania biofilmu na powierzchni biopolimerów [1, 13]. *C. parapsilosis* stała się również drugim pod względem częstości izolacji gatunkiem występującym u pacjentów z kandydemią. Przyczyna wzrostu liczby tego typu infekcji jest w chwili obecnej tematem dyskusji. Przyjmuje się, że gatunek ten posiada znacznie większą zdolność adhezji do powierzchni sztucznych np. akrylu niż *C. albicans*. Cecha ta zwiększa możliwość kolonizacji i ekspansji gatunku [1].

C. tropicalis jest czwartym najczęstszym gatunkiem powodującym zakażenia uogólnione w Ameryce Północnej (7% przypadków). Czynnikiem ryzyka związa-

nymi z wystąpieniem infekcji są: neutopenia i występowanie mukozytów [57]. Wykazano, że gatunek ten jest najczęstszym czynnikiem etiologicznym fungemii u pacjentów onkologicznych [29, 54].

3. Czynniki wirulencji grzybów drożdżopodobnych z rodzaju *Candida*

Możliwość inwazji do tkanek gospodarza, przeżycie i bytowanie w jego organizmie (dzięki stworzeniu odpowiedniej niszy) oraz rozwój infekcji, grzyby drożdżopodobne zawdzięczają posiadanym czynnikom wirulencji. Tavanti i wsp. wyróżnili następujące czynniki wirulencji u *C. albicans*: zmiana fenotypu, adhezyny, dimorfizm oraz wydzielanie enzymów hydrolitycznych takich jak proteazy aspartylowe i fosfolipazy [73]. Zdolność adhezji do tkanek gospodarza, zmian morfologii oraz sekrecji enzymów hydrolitycznych zostały opisane u wszystkich gatunków z rodzaju *Candida* [68]. Atrybuty wirulencji odgrywają istotną rolę podczas procesu kolonizacji oraz rozwoju infekcji, stając się tym samym czynnikami o dwójnej funkcji [50]. Patogeneza różnych form kandydozy zależy od zróżnicowanej i czasowej regulacji ekspresji genów związanych z dimorfizmem, adhezją i sekrecją enzymów [47]. Ze względu na niski potencjał wirulencji grzybów z rodzaju *Candida*, jedynie korzystne warunki panujące w organizmie gospodarza umożliwiają im rozwój infekcji. Zmiana formy komensalnej na inwazyjną możliwa jest podczas osłabienia mechanizmów obrony gospodarza [15, 47, 68].

3.1. Zjawisko adhezji

Pierwszym, krytycznym etapem zakażenia grzybiczego jest adhezja komórek [36], złożony, wieloczynnikowy proces, angażujący kilka typów adhezyn [52]. Białka te wykazują różną ekspresję na komórkach drożdżowych i na powierzchni strzępek oraz pośredniczą w adhezji poprzez różnorodne mechanizmy [83]. W pierwotnym wiązaniu się komórek *Candida* do kolonizowanej powierzchni pośredniczą zarówno czynniki niespecyficzne np. hydrofobowość powierzchni lub siły elektrostatyczne jak i specyficzne białka adhezyjne [59]. Adhezja zachodzi zarówno na powierzchni błon śluzowych gospodarza jak również na powierzchniach sztucznych i zależy od różnorodnych czynników [18]. Komórki *Candida* wiążą się do kilkunastu białek matrix zewnątrzkomórkowego tkanek żywiciela, wśród których wymienić należy: fibronektynę, lamininę fibrynogen, czy kolagen typu I i IV [8]. Kluczową rolę w procesie kolonizacji odgrywają substancje adhezyjne, umożliwiające przyleganie komórek patogenu do komórek żywiciela.

3.2. Białka adhezyjne *Candida* spp. – mannoproteiny

Główne adhezyny *Candida* spp. – mannoproteiny są zawarte w ścianie komórkowej grzyba i pośredniczą w przyleganiu do nabłonków. Szczepy cechujące się wyższą zdolnością adhezyjną cechuje tym samym większa patogenność [20]. W porównaniu z gatunkami *C. albicans*, *C. tropicalis* i *C. parapsilosis* mniejsze właściwości adhezyjne posiada *C. glabrata*. Jako przyczynę tego zjawiska podaje się brak zdolności tworzenia strzępki właściwej przez ten gatunek [47]. Mannoproteiny wiążą się do powierzchni epitelium poprzez receptor glukozydów, który może być glikosfingolipidem lub antygenem grupy krwi. Istotną rolę w przyleganiu pełni również hydrofobowość powierzchni komórki, ma ona znaczenie w szczególności podczas adhezji do materiałów sztucznych [18]. Mannoproteiny posiadają również dodatkowe znaczenie, pochodzący z nich wielocukier jest związkiem o działaniu degradującym tkanki i hamującym funkcje neutrofilów [20].

3.3. Białka adhezyjne *Candida* spp. – EPA i ALS

Główne adhezyny występujące u *C. glabrata* to produkty genów EPA (epithelial adhesin – nabłonkowe białka adhezyjne) [53]. Rodzina genów EPA składa się z kilkunastu przedstawicieli, wśród nich najistotniejszą rolę odgrywa EPA1 kodujący lektynę. Udowodniono, że mutanty pozbawione produktu genu EPA1 wykazują zredukowane właściwości przylegania do powierzchni kolonizowanej [41, 80]. Delecja genu EPA6 powoduje natomiast zredukowanie zdolności tworzenia biofilmu [34]. U gatunku *C. albicans* istotną rolę w adhezji odgrywa rodzina genów ALS (agglutinin-like sequence, sekwencja genu przypominająca aglutyninę) kodująca osiem białek [11, 53] przypominających budowę proteiny powierzchniowe Epa. Wykazują one dużą homologię z aglutyninami *S. cerevisiae* [8]. W ich sekwencji aminokwasowej wykryto domeny odpowiedzialne za formowanie agregatów o charakterze amyloidu. Komórki drożdżowe ekspresjonujące ten typ adhezyn powierzchniowych wykazują szybkie tempo agregacji, agregaty posiadają cechy amyloidu [61]. Przyleganie komórek *Candida* do podłoża i dalszy rozwój biofilmu zależy od dwóch typów białek powierzchniowych: Als1/3 oraz Hwp1 (hyphal-specific cell wall protein – białko ściany komórkowej charakterystyczne dla formy strzępkowej). Uważa się, że funkcjonują one jako wzajemnie uzupełniające się adhezyny powierzchniowe. Als1 i Als3 są do siebie bardzo zbliżone zarówno pod względem sekwencji, regulacji i funkcji. Hwp1 to proteina znana jako substrat dla transglutaminazy, umożliwiająca kowalentne wiązanie *C. albicans* do komórek epitelium. Dostępne dane sugerują, iż w trakcie powstawania środowiska biofilmu białka Als1/3 wiążą się do powierzchni sąsiednich

komórek poprzez białko Hwp1 [53, 83]. Proces wzajemnego wiązania się pojedynczych strzępek jest ważnym etapem procesu tworzenia biofilmu [83]. Białko Als1 jest szczególnie istotne w procesie adhezji do błon śluzowych we wczesnym etapie infekcji [80]. Wielu badaczy podkreśla rolę pozostałych białek z rodziny Als w procesie adhezji. Udowodniono, że do osiągnięcia maksymalnego poziomu adhezji do komórek endotelium wymagany jest równoczesny, wysoki poziom ekspresji dwóch adhezyn Als2 i Als4 [24]. Podczas gdy Als 1, 3 i 5 pośredniczą w wiązaniu komórek drożdżowych do wielu składników tkankowych gospodarza np. komórek epitelium jamy ustnej, Als 6 i 9 posiadają znacznie bardziej ograniczone właściwości wiązań i nie wykazują adhezji do komórek nabłonkowych [83].

3.4. Inne istotne w procesie przylegania białka adhezyjne *Candida* spp.

Podczas badań nad heterologiczną ekspresją białek przez gatunki grzybów drożdżopodobnych u *C. albicans* została wykryta adhezyna Eap1 (extracellular adherence protein – zewnątrzkomórkowe białko adhezyjne). Jej struktura przypomina białka z rodziny Als. Udowodniono, że Eap1 pośredniczy w wiązaniu komórek grzybiczych do nabłonka nerkowego oraz do materiałów sztucznych np. polistyrenu [83]. Białko Int1 (integrin-like protein – białko przypominające integrinę) *C. albicans* odgrywa istotną rolę w adhezji i filamentacji komórek tego gatunku. Umożliwia ono wiązanie do fibrynogenu, lamininy i kolagenu, a mutanty pozbawione Int1 cechuje zmniejszona wirulencja i adhezja do komórek epitelium. Proteina ta przypomina budową receptory komórek ssaczy – integriny. Dostępne dane wymieniają jeszcze inną ważną cząstkę adhezyjną *C. albicans*, białko Mnt1 (Mannosyltransferase – transferaza mannozy). Błonowa proteina typu II istotna jest w procesie glikozylacji białek mannanem [8, 80]. Wśród innych gatunków z rodzaju *Candida* geny kodujące białka Als wykryto u *C. tropicalis* i *C. dubliniensis* [80, 83] oraz *C. parapsilosis*, *C. lusitaniae* i *C. guilliermondii* [83].

4. Zjawisko wzrostu w postaci biofilmu

Biofilm definiowany jest jako społeczna struktura mikroorganizmów związana z podłożem i zamknięta w zewnątrzkomórkowej matrix [10, 59].

4.1. Budowa biofilmu

Biofilm tworzy się zarówno na powierzchniach sztucznych materiałów jak również na błonach śluzowych w organizmie żywiciela. Składa się on z komórek

jednego lub więcej gatunków mikroorganizmów oraz z wytwarzanego przez nie zewnątrzkomórkowej matrix [17]. Matrix zbudowane jest zazwyczaj z glikoprotein i polisacharydów syntetyzowanych przez komórki drobnoustrojów tworzących strukturę [10]. Posiada kanały, poprzez które odbywa się transport substancji pomiędzy warstwą powierzchniową, a warstwami biofilmu położonymi głębiej. Komórki otoczone matrix ściśle do siebie przylegają. Biofilm jest strukturą heterogenną, ponadto zorganizowaną [19] i posiadającą wyspecjalizowane warstwy. Mikroorganizmy znajdujące się w dojrzałej formie biofilmu wykazują różnice w tempie wzrostu, metabolizmie, syntezie substancji zewnątrzkomórkowej, wymagań odżywczych czy też poboru tlenu [17]. Strzępki są podstawowym elementem wprowadzającym strukturalną integralność i wielowarstwową architekturę charakterystyczną dla dojrzałego, w pełni rozwiniętego biofilmu [59]. Biofilm utworzony przez grzyby drożdżopodobne z grupy non – *C. albicans* to twór jednowarstwowy z nieregularnymi skupiskami komórek Y i niewielkiej ilości matrix [19]. Biofilm *C. parapsilosis* nie wykazuje dwufazowego układu odrębnych warstw. Składa się z nieregularnych pasm utworzonych z komórek [48]. Szczepki tego gatunku tworzą mniejsze ilości biofilmu, o mniej złożonej strukturze niż gatunek *C. albicans*. Formy pseudostrzępkowe *C. parapsilosis* generują jego większe ilości w porównaniu z fenotypami złożonymi z komórek drożdżowych, dodatkowo cechuje się on większą inwazyjnością [75]. Architektura biofilmu *C. albicans* zależy od powierzchni kolonizowanego substratu. Biofilm wytworzony na gładkiej, hydrofobowej powierzchni posiada wyraźną, dwufazową strukturę złożoną z warstwy zaadherowanych blastospor pokrytą elementami strzępkowymi, osadzoną w warstwie pozakomórkowej matrix. Podczas gdy biofilm tworzony na powierzchni szorstkiej i nieregularnej to gęste pasma komórek rosnących wzdłuż nierównych krawędzi powierzchni podczas fazy dojrzewania, z przerostami komórek i macierzy w biofilmie dojrzałym [48]. W zależności od rodzaju i hydrofobowości kolonizowanej powierzchni biofilm może osiągać grubość 25–450 µm [45]. Skład białek i węglowodanów w matrix zewnątrzkomórkowej różni się w zależności od stadiów rozwoju biofilmu. W fazie wczesnego wzrostu zawiera ona mniej związków węglowodanowych w porównaniu do fazy dojrzałej [48].

4.2. Występowanie oraz rola biofilmu

Zjawisko wytwarzania przez komórki *Candida* spp. biofilmu jest jedną z ważniejszych cech umożliwiających rozwój infekcji, ma duże znaczenie w patogenności oraz w samym procesie zakażenia [45]. Zjawisko to jest czynnikiem powodującym 65% wszystkich infekcji szpitalnych [17, 45]. Udowodniono, że infek-

cje powodowane przez izolaty *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* czy *C. glabrata* posiadające zdolność wytwarzania biofilmu cechuje wysoka śmiertelność [75]. Wiele danych sugeruje, że dwa gatunki *C. albicans* i *C. parapsilosis*, w szczególności izolaty pochodzące z zakażeń uogólnionych posiadają największą zdolność tworzenia biofilmu. Udowodniono również, iż stosowanie TPN stymuluje rozwój biofilmu, głównie *C. parapsilosis* [36, 67, 72]. Wzrost drożdżaków np. *C. albicans* w preparatach do żywienia pozajelitowego jest postrzegany jako ważny czynnik ryzyka rozwoju fungemii odcewnikowych u tej grupy chorych. W trakcie rozwoju struktury biofilmu, wytwarzane w odpowiedzi na dużą dostępność emulsji lipidowych formy strzępkowe, wspomagają adhezję patogenu i inwazję do tkanek. Struktura ta charakteryzuje się obecnością zwiększonej liczby elementów strzępkowych w porównaniu do biofilmu wytworzonego bez dostępu do substancji lipidowych [72]. Biofilm *Candida* często powstaje na biomateriałach, z których wykonywane są implanty, cewniki, drenaże oraz protezy [19, 48], mających bezpośredni kontakt z tkankami pacjenta [45]. Większość mikroorganizmów odpowiedzialnych za rozwój infekcji, związanych z używaniem tego rodzaju materiałów, jest w stanie przetrwać na ich powierzchni w bogatym w polisacharydy środowisku [48]. W organizmie żywym występowanie biofilmu najczęściej obserwuje się w jelicie grubym i jamie ustnej, gdzie zazwyczaj pełni rolę fizjologiczną [19].

4.3. Rozwój biofilmu

Podczas rozwoju biofilmu wyróżnia się następujące fazy: wczesną, pośrednią, dojrzewania oraz rozsiewu. Faza wczesna trwa ok. 11 godzin od momentu adhezji pierwszych komórek do kolonizowanej powierzchni. Komórki drożdżowe w formie planktonicznej osiadają na niej i tworzą ściśle połączenia. Po upływie 3–4 godzin pojawiają się mikrokolonie. Następująca potem faza pośrednia (12–30 godzin) cechuje się wytwarzaniem przez komórki matrix składającej się z glikozyłowanych polisacharydów mannanowych. Na tym etapie komórki różnicują się na pseudostrzępki i strzępki. W fazie dojrzewania następuje dalsza produkcja macierzy, komórki grzybowe zostają całkowicie w niej uwięzione [11, 14, 19, 48, 72]. Strzępki tworzące się w warstwie podstawnej przerastają zewnątrzkomórkową matrix sięgając od blastospor poprzez całą szerokość warstwy [11]. Ostatnim etapem tworzenia biofilmu jest faza rozsiewania. Po osiągnięciu maksymalnej gęstości komórek w jego wnętrzu część blastospor posiadających zdolność do odłączania się od macierzy rozprasza się i inicjuje nowy biofilm w miejscu jeszcze niezajętym. Uważa się, że jest to proces regulowany przez cząsteczki sygnałowe, wydzielane w systemie komunikacji komórek.

Blastospory uwalniane ze skolonizowanej powierzchni posiadają istotną cechę umożliwiającą im opuszczenie zajmowanego środowiska – regulują posiadane adhezyny zmniejszając własną zdolność adhezji [14, 22, 44]. Należy podkreślić, iż na rozwój biofilmu ma wpływ wiele czynników, w tym cechy szczepu i środowisko wzrostu [72].

4.4. Oporność biofilmu na leki przeciwgrzybicze

Cechą charakterystyczną szczepów grzybów tworzących biofilm jest ich oporność na większość leków stosowanych w terapii [19, 48] oraz ochrona przed układem immunologicznym gospodarza. Stężenie leków przeciwgrzybiczych wykazujące skuteczność w stosunku do szczepów zasiedlających biofilm osiąga wartości od 5 do 8 razy wyższe niż w przypadku szczepów nie osiadłych [46]. Badania dowiodły, że wykazują one wrażliwość jedynie na echinokandyny i lipidowe formy amfoterycyny B. Tolerancja wysokich stężeń związków przeciwgrzybiczych może być spowodowana obecnością struktury stanowiącej osłonę komórek przed niekorzystnymi warunkami środowiska zewnętrznego. Wśród przyczyn odgrywających istotną rolę w rozwoju oporności biofilmu podawane są: czynny wyrzut leku – efflux, niewystarczająca możliwość jego penetracji w głąb macierzy, obecność steroli w błonach komórkowych grzybów, zjawisko „phenotypic switching” (przełączanie fenotypowe), niska aktywność metaboliczna komórek oraz tworzenie komórek przetrwałych [10, 46, 48]. Niektóre dane sugerują również, że notowana oporność biofilmu może być wynikiem bardzo dużej gęstości/liczebności komórek występujących w tej strukturze [66].

5. Sekrecja enzymów hydrolitycznych

Enzymy wydzielane przez grzyby do środowiska są znanymi czynnikami wirulencji wszystkich grzybów drożdżopodobnych. Jednakże ich profil może wykazywać znaczne różnice w zależności od rozpatrywanego gatunku [36]. Profil wydzielanych enzymów a także ich aktywność, może wskazywać na stopień zjadliwości danego szczepu.

5.1. Hydrolazy

Enzymy hydrolityczne pośredniczą w adhezji i inwazji komórek patogenu do tkanki gospodarza. N-acetylo- β -glukozaminidaza i α -mannozydaza hamują migrację neutrofilów i osłabiają aktywność granulocytów obojętnochłonnych. Esteraza, lipazy i fosfatazy są uważane za szczególnie ważne w pierwszej fazie zakażenia, ponieważ umożliwiają dostarczenie grzybom węgla niezbędnego

do wszystkich procesów życiowych, a następnie do rozwoju zakażeń [4, 16]. Umożliwiają one penetrację patogenu do tkanek, przerywanie ich ciągłości i łzę błon komórkowych, w szczególności w jamie ustnej i drogach rodnych [76].

5.2. Proteazy

Proteazy aspartylowe wydzielane zewnątrzkomórkowo degradują keratynę i kolagen [5], a także białka związane z odpowiedzią immunologiczną gospodarza: łańcuch ciężki przeciwciał IgG, α_2 -makroglobulinę, białko C₃, β -laktoglobulinę, laktoperoksydazę [58]. Doprowadzają do uszkodzenia nabłonka w miejscu inwazji i umożliwiają przemieszczanie się patogenu w obrębie tkanki. Natomiast proteazy kwaśne ochraniają komórki grzyba przed fagocytozą [5]. Szczepy grzybów charakteryzujące się wysoką sekrecją enzymów cechuje większa zdolność adhezji do komórek nabłonkowych i większa zjadliwość [38]. Dowiedziono, że wyższa aktywność proteaz asparaginowych występuje u szczepów izolowanych z ostrych stanów infekcyjnych [37].

Proteazy aspartylowe (Saps-secreted aspartyl proteases) zostały rozpoznane jako czynniki wirulencji od momentu ich odkrycia. Proteazy aspartylowe *C. albicans* są kodowane przez wielogenową rodzinę obejmującą przynajmniej 10 różnych wysoko regulowanych genów (*SAP1-10*) [73]. Geny zostały sklasyfikowane w trzy odrębne podrodziny w oparciu o sekwencję aminokwasową. Enzymy Sap1-3 utworzyły grupę o podobieństwie sekwencji 75%, natomiast Sap4-6 90% [23, 32, 33]. Proteazy te syntetyzowane są jako preproenzymy i wydzielane zewnątrzkomórkowo za pośrednictwem ścieżki sekrecyjnej [51]. Produkty białkowe genów SAP1-3 produkowane są zarówno przez komórki drożdżowe oraz formy pseudostrzępkowe *C. albicans*. Proteazy Sap4-6 wydzielane są głównie przez pseudostrzępki [23, 32]. Geny SAP1-3 wykazują ekspresję w początkowym stadium kolonizacji epitelium oraz podczas postępującego uszkodzania tkanek. Wskazuje to na rolę proteaz Sap1-3 w inicjowaniu infekcji w obrębie powierzchni błon śluzowych [50]. Geny kodujące proteazy aspartylowe SAP7 i SAP8 *C. albicans* nie wykazują pokrewieństwa między sobą ani z pozostałymi genami SAP. Podobny brak pokrewieństwa ustalono dla genów SAP9 i SAP10. Istotną cechą proteaz Sap9 i 10 jest C-terminalna sekwencja aminokwasowa, kotwicząca te białka w błonie komórkowej [47]. Analiza ich sekwencji dowiodła znacznego podobieństwa do genów proteaz YPS1 i 2 *S. cerevisiae* [35]. Ekspresja genów SAP8-SAP10 występuje stale pod wpływem większości czynników środowiskowych zarówno u formy drożdżowej jak i strzępkowej grzyba [32]. Produkcja kilku enzymów Sap posiadających różne optimum pH

najprawdopodobniej umożliwia *C. albicans* kolonizację i infekcje różnych tkanek i środowisk. Podczas gdy optymalne pH do aktywności proteaz wydzielanych przez formę drożdżową (Sap1-3) wynosi pomiędzy 3–5, optimum pH dla Sap4-6 – wydzielanych przez formę strzępkową to 5-7. Najwyższe ilości transkryptów genów SAP5, 6 i 9 wykryto wewnątrz struktury dojrzałego biofilmu [50].

Gatunek *C. albicans* nie jest jedynym gatunkiem *Candida* wydzielającym proteazy. Ich sekrecje wykazano również u innych gatunków z rodzaju *Candida* np. u *C. tropicalis* i *C. parapsilosis* [5, 47]. Wykazano, że wiele patogennych gatunków *Candida* posiada geny SAP łącznie z: *C. dubliniensis*, *C. tropicalis* i *C. parapsilosis* [52]. *C. tropicalis* posiada cztery geny SAP, *C. parapsilosis* trzy, natomiast *C. dubliniensis* osiem [52, 56].

Geny kodujące proteazy aspartylowe *C. tropicalis* są od siebie odrębne i nie można ich sklasyfikować jako jednej rodziny, tak jak to przedstawiono u *C. albicans*. Podobieństwo ich sekwencji nie przekracza 63%. Gen SAP1 *C. tropicalis* jest jednak spokrewniony z SAP8 *C. albicans*, a gen kodujący SAP4 z rodziną SAP1-3 [47, 81].

Gatunek *C. glabrata*, który w ostatniej dekadzie zyskał duże znaczenie kliniczne, nie posiada w genotypie genów SAP, w związku z tym wykazuje niski poziom zewnątrzkomórkowej aktywności proteolitycznej [41]. Według najnowszych danych gatunki nie wytwarzające proteaz Sap, produkują białka o aktywności proteaz aspartylowych blisko spokrewnionych z yapsynami *Saccharomyces cerevisiae*. Enzymy te, nazwane proteazami Yps odgrywają ważną rolę w wirulencji *Candida glabrata* [34,35]. W genotypie grzyba *C. glabrata* zidentyfikowano klaster 11 genów YPS kodujących proteazy aspartylowe, które pełnią istotną rolę w utrzymaniu integralności ściany komórkowej, adherencji do komórek gospodarza, przeżyciu komórek grzyba wewnątrz makrofagów oraz wirulencji [34, 56]. Dowiedziono, że enzymy Yps związane są kowalentnie ze ścianą komórkową *C. glabrata*, ich miejsce aktywne posiada kontakt ze środowiskiem zewnętrznym [78].

5.3. Fosfolipazy

Fosfolipazy to kolejna grupa enzymów odpowiedzialna za wirulencję grzybów z rodzaju *Candida*. Biorą one udział w adherencji komórek do tkanek gospodarza i ich penetracji [65]. Nazwa fosfolipazy odnosi się do grupy enzymów hydrolizujących wiązania estrowe w glicerofosfolipidach. W zależności od miejsca docelowego działania enzymy te dzielą się na fosfolipazy A, B, C i D oraz lizofosfolipazy (Lyso-PL) [27]. Pomimo, że fosfolipaza to ważny czynnik wirulencji *C. albicans* jej rola u innych gatunków pozostaje niejasna. Wiele szczepów *C. parapsilosis* wydziela fosfolipazę jednakże nie

ustalono korelacji pomiędzy jej aktywnością a miejscem rozwoju infekcji lub obecnością innych czynników wirulencji [36]. Komórki *C. albicans* syntetyzują kilka hydrolaz wykazujących aktywność fosfolipazy: A, B1, B2, C oraz D. Fosfolipaza B1 została scharakteryzowana jako główny czynnik wirulencji grzyba [64]. Obie formy enzymu: Plb1 oraz Plb2 są wydzielane zewnątrzkomórkowo [52]. Enzym ten posiada aktywności hydrolazy: fosfolipazy B i lizofosfolipazy oraz transacetylazy [27]. Fosfolipaza A jest związana z procesem pączkowania, natomiast D odgrywa istotną rolę w przemianie formy drożdżowej w strzępkową [64]. Sekrecja fosfolipazy *C. albicans* zachodzi podczas rozwoju strzępki. Jej najwyższa aktywność występuje na końcu strzępki, w miejscu kontaktu z tkanką. Ilość produkowanej przez komórki grzyba fosfolipazy różni się w zależności od szczepu i od miejsca infekcji. Izolaty hodowane z krwi wydzielają znacznie większe ilości tego enzymu niż izolaty z moczu. Sekrecja enzymu powiązana jest również z fenotypem szczepu. Wykazano, iż fenotypy *C. albicans* „star” i „ring” wydzielają fosfolipazę w ilości podobnej do fenotypu „dzikiego”. Natomiast fenotyp „stipple” wydziela jej do 34% więcej [27]. Mukherjee i wsp. udowodnili, że szczep pozbawiony genu PLB1 kodującego fosfolipazę cechuje się zmniejszoną wirulencją [49]. Wydzielanie fosfolipaz zostało wykryte również u innych gatunków z rodzaju *Candida*. Gatunek *C. glabrata* charakteryzuje się sekrecją enzymu o aktywności fosfolipazy B oraz lizofosfolipazy podobnie jak to zaobserwowano u *C. albicans* [27, 41]. Pomimo obecności i ekspresji genów kodujących fosfolipazy, ich rola w wirulencji gatunku *C. glabrata* jest wciąż analizowana i pozostaje kwestią sporną [34].

6. Zjawisko dimorfizmu

Wiele gatunków w tym *C. albicans* posiada zdolność wzrostu zarówno w formie jednokomórkowej (drożdżowej) i pseudostrzępkowej lub strzępkowej [77]. Zdolność ta polegająca na zmianie morfologii komórki nazwana została dimorfizmem [50]. Pączkujące blastospory *Candida* określane są mianem komórek Y (forma Y-yeast) natomiast forma micelialna nosi nazwę komórek M (forma M-mycelium). Zmiana form komórek uzależniona jest w dużym stopniu od warunków środowiska [19]. Morfologiczna zmiana komórek grzyba z drożdżopodobnej na pseudostrzępkową jest jedną z najważniejszych cech umożliwiających kolonizację, inwazję oraz przeżycie w tkankach gospodarza podczas infekcji [26]. Komórki drożdżowe pełnią istotną rolę w procesie rozsiewu patogenu do tkanek żywiciela, natomiast formy strzępkowe są najbardziej istotne w trakcie inwazji [55, 72, 74]. Udowodniono, że obie formy *C. albicans* są zdolne do wytworzenia struktury

biofilmu [11]. Morfologiczna rozbieżność form *C. albicans* związana jest z rozwojem infekcji, „ucieczką” przed działaniem leków przeciwgrzybiczych [26] oraz przed systemem immunologicznym gospodarza [65]. Mikroorganizm ten jest w stanie wzrastać w postaci dwóch form jednocześnie: pączkujących komórek drożdżowych oraz wydłużających się form strzępkowych. Z miejsca toczącego się zakażenia izolowane są zazwyczaj obie formy grzyba, jednakże uważa się, że to forma strzępkowa rozwinęła się pierwotnie jako mechanizm penetracji tkanek [26, 79]. Formowanie strzępki jest, więc istotne w rozwoju rozsianych infekcji głębokich [55]. Czynniki, które mają wpływ na morfologię grzybów są różnorodne. Sygnały środowiskowe: pH, temperatura, stężenie glukozy i tlenu są stymulatorami włączającymi zmiany genetyczne zaangażowane w ekspresję swoistych genów. Synteza białek regulatorowych i enzymów tworzy biochemiczną podstawę do wzrostu dimorficznego. Surowica krwi jest znanym czynnikiem mającym wpływ na transformację komórek *C. albicans* [26]. N-acetyloglukozamina związek syntetyzowany przez drobnoustroje bytujące w przewodzie pokarmowym indukuje proces filamentacji komórek drożdżowych zasiedlających błony śluzowe jelit. Udowodniono również, że związek ten jest silnym induktorem zjawiska „phenotypic switching” i wpływa na powstawanie strzępkowych form morfologicznych drożdżaków [31]. Wśród czynników transkrypcyjnych odpowiedzialnych za dimorfizm u grzybów drożdżopodobnych wielu autorów za najistotniejszy uważa białko EFG1. Czynnikiem transkrypcyjnym EFG1 jest aktywatorem procesu transformacji formy drożdżowej w pseudostrzępkową poprzez oddziaływanie na szlak cAMP [26]. Aby uniemożliwić rozdział komórek w strzępce, geny kodujące enzymy odpowiedzialne za ten proces muszą zostać zahamowane. Fosforyzowany, tym samym aktywowany czynnik Efg1 wiąże się do promotorów tych genów, powodując supresję ekspresji enzymów [77]. Obniżony poziom ekspresji czynnika EFG1 hamuje

tworzenie formy strzępkowej lecz nie pseudostrzępkowej. Podwójne mutanty Efg1/Efg1 wytwarzają strzępki morfologicznie różne od formy „dzikiej” [71]. Podczas rozwoju infekcji mutanty pozbawione czynnika EFG1 wykazują wysoce zredukowaną zdolność do tworzenia strzępki, pociąga to za sobą zmniejszenie syntezy proteaz Sap4-Sap6 [32, 50]. Udowodniono też, że mutanty nie posiadające genów filamentacyjnych wykazują zmniejszoną wirulencję i niższy poziom infekcyjności w stosunku do komórek endotelium [60]. Efg1 jest również kluczowym czynnikiem niezbędnym dla formowania i rozwoju biofilmu *Candida* [59, 60]. Drugi szlak sygnałowy decydujący o zmianie morfotypu *Candida* to ścieżka białek Ste [7, 8, 80]. Białko Ste12 to czynnik transkrypcyjny odpowiedzialny między innymi za wzrost w postaci pseudostrzępkowej [7, 80]. Zidentyfikowano liczne białka będące supresorami morfogenezy u grzybów. Najistotniejszymi z nich są białka Tup1 i Rbf1. Szczep *C. albicans* pozbawiony białka Tup1 stale tworzy formę strzępkową [6, 8, 80]. Dowiedziono, iż gen TUP1 *C. albicans* koduje supresor genów odpowiedzialnych za generowanie wzrostu filamentowego [6].

7. Podsumowanie

Pacjenci otrzymujący TPN stanowią jedną z grup predysponowanych do rozwoju grzybic o etiologii *Candida* spp. Wiele dostępnych danych literaturowych podkreśla, iż szczepy grzybów drożdżopodobnych charakteryzują się różnymi poziomami wirulencji. Niezaprzeczalnym stał się fakt, że nie wszystkie szczepy jednego gatunku posiadają te same cechy inwazyjności i wirulencji. Najważniejszymi cechami wirulencji istotnymi w rozwoju zakażenia grzybiczego w grupie pacjentów otrzymujących całkowite żywienie pozajelitowe są: adhezja i zdolność do tworzenia środowiska biofilmu oraz sekrecja enzymów proteo- i lipolitycznych. W tabeli zestawiono czynniki wirulencji grzybów

Tabela I
Czynniki wirulencji grzybów drożdżopodobnych z rodzaju *Candida* oraz wpływ na rozwój infekcji

Cecha wirulencji	Wpływ na rozwój infekcji grzybiczej
ADHEZJA	<ul style="list-style-type: none"> - kolonizacja cewnika do żywienia pozajelitowego - brak możliwości mechanicznego usunięcia komórek grzyba - możliwość rozwinięcia fungemii odcewnikowej
BIOFILM	<ul style="list-style-type: none"> - kolonizacja cewnika do żywienia pozajelitowego - brak możliwości mechanicznego usunięcia komórek grzyba - możliwość rozwinięcia fungemii odcewnikowej - ochrona przed działaniem antymikotyków - aktywne namnażanie i rozsiew komórek patogenu
PRODUKCJA LIPAZ	<ul style="list-style-type: none"> - umożliwienie wykorzystania czynników odżywczych zawartych w emulsji do żywienia pozajelitowego
PRODUKCJA PROTEAZ	<ul style="list-style-type: none"> - umożliwienie wykorzystania czynników odżywczych zawartych w emulsji do żywienia pozajelitowego - umożliwienie rozsiewu komórek patogenu do tkanek

drożdżopodobnych z rodzaju *Candida* oraz ich wpływ na rozwój infekcji.

Biorąc pod uwagę przedstawione czynniki należy podkreślić, iż sterylne przygotowywanie preparatów do żywienia, odpowiednia higiena cewników oraz regularne monitorowanie mikrobiologiczne chorych to kluczowe drogi zabiegania rozwojowi zakażeń grzybiczych u pacjentów otrzymujących TPN.

Piśmiennictwo

- Almirante B.A., Rodriguez D., Cuenca-Estrella M., Almela M.: Epidemiology, risk factors and prognosis of *Candida parapsilosis* bloodstream infections: case control population-based surveillance study of patients in Barcelona, Spain, from 2002–2003. *J. Clin. Microb.* **5**, 1681–1685 (2006)
- Amrutkar P.P., Rege M.D., Chen H., LaRocco M.T.: Comparison of Risk factors for Candidemia Versus Bacteremia in Hospitalized Patients. *Infection*, **34**, 322–327 (2006)
- Barberino M.G., Silva N.: Evaluation of blood stream infections by *Candida* in three tertiary hospitals in Salvador, Brazil: a case-control study. *Brasil. J. Infect. Dis.* **10**, 36–40 (2006)
- Batura-Gabryel H., Brajer B., Kuźniar-Kamińska B.: Biotypy enzymatyczne grzybów z rodzaju *Candida albicans* wyizolowanych od chorych na przewlekłą obturacyjną chorobą płuc (POCHP). *Mikol. Lek.* **10**, 243–248 (2003)
- Batura-Gabryel H., Młynarczyk W.: Aktywność proteolityczna i lipolityczna grzybów z rodzaju *Candida* wyizolowanych od chorych na przewlekłe choroby układu oddechowego. *Mikol. Lek.* **7**, 139–143 (2000)
- Braun B.R., Head W.S., Wang M.X., Johnson A.D.: Identification and Characterization of *TUP1*-Regulated Genes in *Candida albicans*. *Genetics*, **156**, 31–44 (2000)
- Calcagno A.M., Bignell E., Rogers T.R., Canedo M.: *Candida glabrata* Ste 20 is involved in maintaining cell wall integrity and adaptation to hypertonic stress, and is required for wild-type levels of virulence. *Yeast*, **21**, 557–568 (2004)
- Calderone R.A., Fonzi W.A.: Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol.* **9**, 327–335 (2001)
- Cano M.V., Perz J.F., Craig A.S. et al.: Candidemia in pediatric outpatients receiving home total parenteral nutrition. *Med. Mycol.* **43**, 219–225 (2005)
- Cate J.M., Klis E.M., Pereira-Cenci T., Crielaard W.: Molecular and Cellular Mechanism That Lead to *Candida* Biofilm Formation. *J. Dent. Res.* **88**, 105–115 (2009)
- Chandra J., Kuhn D.M., Mukherjee P.K., Hoyer L.L.: Biofilm Formation by the Fungal Pathogen *Candida albicans*: Development, Architecture, and Drug Resistance. *J. Bacteriol.* **183**, 5385–5394 (2001)
- Chow J., Golan Y., Ruthazer R., Karcher A.W.: Risk factors for *albicans* and non-*albicans* candidemia in the intensive care unit. *Crit. Care Med.* **36**, 1993–1998 (2008)
- Clark T.A., Slavinski S.A., Morgan J., Lott T.: Epidemiologic and Molecular Characterization of an Outbreak *Candida parapsilosis* Bloodstream Infections in a Community Hospital. *J. Clin. Microb.* **42**, 4468–4472 (2004)
- Cuéllar-Cruz M., López-Romero E., Villagómez-Castro J.C., Ruiz-Baca E.: *Candida* species: new insights into biofilm formation. *Future Microbiol.* **7**, 755–771 (2012)
- Da Costa K.R.C., Ferreira J.C., Lavrador M.A.S., Baruffi M.D., Candido R.C.: Virulence attributes and genetic variability of oral *Candida albicans* and *Candida tropicalis* isolates. *Mycoses*, **55**, 97–105 (2012)
- Dąbkowska M., Swoboda-Kopeć E., Kawecki D., Obuch-Woszczyński P., Stelmach E., Łuczak M.: Badanie aktywności enzymatycznej szczepów *Candida* izolowanych z materiałów klinicznych chorych z układową kandydozą. *Mikol. Lek.* **12**, 123–126 (2005)
- Dawgul M., Barańska-Rybak W., Kamysz W.: Wpływ peptydów przeciwdrobnoustrojowych na zdolności adhezyjne *Candida albicans*. *Sepsis*, **2**, 189–193 (2009)
- Dimopoulos G., Ntziora F., Rachiotis G., Armaganidis A., Falagas M.E.: *Candida albicans* Versus non-*albicans* Intensive Care Unit-Acquired Bloodstream Infections: Differences in Risk Factors and Outcome. *Anesth. Analg.* **106**, 523–529 (2008)
- Dorocka-Bobkowska B., Konopka K.: Powstawanie biofilmu *Candida* i jego znaczenie w patogenezie zakażeń przewlekłych – przegląd piśmiennictwa. *Dent. Med. Prob.* **40**, 405–410 (2003)
- Dzierżanowska D., Dąbkowska M., Garczewska B.: Grzybice narządowe. Patomechanizm, diagnostyka mikologiczna i leczenie. *Medycyna Praktyczna* (2003)
- Essendoubi M., Toubas D., Lepouse C., Leon A.: Epidemiological investigation and typing of *Candida glabrata* clinical isolates by FTIR spectroscopy. *J. Microbiol. Methods*, **71**, 325–331 (2007)
- Estivill D., Arias A., Torres-Lana A., Carrillo-Muñoz A.J., Arévalo M.P.: Biofilm formation by five species of *Candida* on three clinical materials. *J. Microbiol. Methods*, **86**(2), 238–242 (2011)
- Felk A., Kretschmar M., Albrecht A., Schaller M., et al.: *Candida albicans* Hyphal Formation and the Expression of the EFG-1 – Regulated Proteinases SAP4 to SAP6 Are Required for the Invasion of Parenchymal Organs. *Infect. Immun.* **70**, 3689–3700 (2002)
- Filler S.G.: *Candida* – host cell receptor-ligand interaction. *Curr. Opin. Mikrobiol.* **9**, 333–339 (2006)
- Fraher M.H., Collins C.J., Bourke J., Phelan D., Lynch M.: Cost-effectiveness of employing a total parenteral nutrition surveillance nurse for the prevention of catheter-related bloodstream infections. *J. Hosp. Infect.* **73**, 129–134 (2009)
- Ghalehnoo Z.R., Rashki A., Najimi M., Dominguez A.: The role of diclofenac sodium in the dimorphic transition in *Candida albicans*. *Microb. Pathog.* **48**, 110–115 (2010)
- Ghannoum M.A.: Potential Role of Phospholipases in Virulence and Fungal Pathogenesis. *Clin. Microbiol. Rev.* **13**, 122–143 (2000)
- Grubb S. E. W., Murdoch C., Sudbery P.E., Saville S.P.: *Candida albicans* – Endothelial Cell Interaction: Key Step in the Pathogenesis of Systemic Candidiasis. *Infect. Immun.* **76**, 4370–4377 (2008)
- Hoffmann-Santos H.D., Paula C.R., Yamamoto A.C., Tadano T., Hahn R.C.: Six-year trend analysis of nosocomial candidemia and risk factors in two intensive care hospitals in Mato Grosso, midwest region of Brazil. *Mycopathologia*, **176**, 409–415 (2013)
- Hope W., Morton A., Eisen D.P.: Increase in prevalence of nosocomial non-*Candida albicans* candidaemia and the association of *Candida krusei* with fluconazole use. *J. Hosp. Infect.* **50**, 56–65 (2002)
- Huang G., Yi S., Sahni N., Daniels K.J., Srikantha T.: N-Acetylglucosamine Induces White to Opaque Switching, a Mating Prerequisite in *Candida albicans*. *PLoS Pathog.* **6**, 1–13 (2010)
- Hube B., Naglik J.: *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of gene family. *Microbiology*, **147**, 1997–2005 (2001)
- Kalkanci A., Bozdayi G., Biri A., Kustimur S.: Distribution of Secreted Aspartyl Proteinases Using a Polymerase Chain Reaction Assay with SAP Specific Primers in *Candida albicans* Isolates. *Folia Microbiol.* **50**, 409–413 (2005)

34. Kaur R., Domergue R., Zupancic M.L., Cormack B.P.: A yeast by any other name: *Candida glabrata* and its interaction with the host. *Curr. Opin. Microbiol.* **8**, 378–384 (2005)
35. Krysan D.J., Ting E.L., Abeijon C., Kroos L., Fuller R.S.: Yapsins Are a Family of Aspartyl Proteases Required for Cell Wall Integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot. Cell*, **4**, 1364–1374 (2005)
36. Kuhn D.M., Mukherjee P.K., Clark T.A., Pujol C.: *Candida parapsilosis* Characterization in an Outbreak Setting. *Emerging Infect. Dis.* **10**, 1074–1081 (2004)
37. Kurnatowska A.J., Kurnatowski P.: Biotypes of fungi isolated from patients with oral cavity diseases. *Mikol. Lek.* **5**, 213–217 (1998)
38. Kurnatowska A.J., Rózga A., Kurnatowski P.: Aktywność proteinyzyny asparaginowej szczepów grzybów izolowanych z jamy ustnej. *Mikol. Lek.* **6**, 21–25 (1999)
39. Kuwahara T., Kaneda S., Shimono K., Inoue Y.: Growth of Microorganisms In Total Parenteral Nutrition Solutions Without Lipids. *Int. J. Med. Sci.* **7**, 43–47 (2010)
40. Kuwahara T., Shimono K., Kaneda S., Tamura T., Ichihara M., Nakashima Y.: Growth of Microorganisms In Total Parenteral Nutrition Solutions Containing Lipids. *Int. J. Med. Sci.* **7**, 101–109 (2010)
41. Li L., Redding S., Dongari-Bagtzoglou A.: *Candida glabrata*, an Emerging Oral Opportunistic Pathogen. *J. Dent. Res.* **86**, 204–215 (2007)
42. Luzzati R., Cavinato S., Giangreco M., Granà G., Centonze S., Deiana M.L., Biolo G., Barbone F.: Peripheral and total parenteral nutrition as the strongest risk factors for nosocomial candidemia in elderly patients: a matched case-control study. *Mycoses*, **56**(6), 664–671 (2013)
43. Marra A.R., Opilla M., Edmond M.B., Kirby D.F.: Epidemiology of Bloodstream Infections in Patients Receiving Long-term Total Parenteral Nutrition. *J. Clin. Gastroenterol.* **41**, 19–28 (2007)
44. Mnichowska-Polanowska M., Giedrys-Kalemba S.: Metody i techniki stosowane w badaniach nad biofilmem *Candida*. *Mikol. Lek.* **16**, 238–242 (2009)
45. Mnichowska-Polanowska M., Kaczała M., Giedrys-Kalemba S.: Charakterystyka biofilmu *Candida*. *Mikol. Lek.* **16**, 159–164 (2009)
46. Mnichowska-Polanowska M., Kaczała M., Giedrys-Kalemba S.: Lekooporność oraz zwalczanie biofilmu *Candida*. *Mikol. Lek.* **16**, 165–169 (2009)
47. Monod M., Borg-von Zepelin M.: Secreted Aspartic Proteases as Virulence Factors of *Candida* Species. *Biol. Chem.* **383**, 1087–1093 (2002)
48. Mukherjee P.K., Chandra J., Kuhn D.M., Ghannoum M.A.: Differential expression of *Candida albicans* phospholipase B (*PLB1*) under various environmental and physiological conditions. *Microbiology*, **149**, 261–267 (2003)
49. Mukherjee P.K., Chandra J.: *Candida* biofilm resistance. *Drug Resist. Updat.* **7**, 301–309 (2004)
50. Naglik R.J., Albrecht A., Bader O., Hube B.: *Candida albicans* proteinases and host/pathogen interaction. *Cell. Microbiol.* **6**, 915–926 (2004)
51. Naglik R.J., Challacombe S.J., Hube B.: *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microb. Mol. Biol. Rev.* **3**, 400–428 (2003)
52. Naglik R.J., Rodgers C.A., Shirlaw P.L., Dobbie J.L.: Differential Expression of *Candida albicans* Secreted Aspartyl Proteinase and Phospholipase B Genes in Humans Correlates with Active Oral and Vaginal Infections. *J. Infect. Dis.* **188**, 469–479 (2003)
53. Nobile C.J., Schneider H.A., Nett J.E., Sheppard D.C.: Complementary adhesion function in *C. albicans* biofilm formation. *Curr. Biol.* **18**, 1017–1102 (2008)
54. Nucci M., Silveira M.I., Spector N., Silveira F., Velasco E., Martins C.A., Derossi A., Colombo A.L., Pulcheri W.: Fungemia in cancer patients in Brazil: predominance of non-albicans species. *Mycopathologia*, **141**, 65–68 (1998)
55. Pärnänen P., Meurman J.H., Samaranyake L., Virtanen I.: Human oral keratinocyte E-cadherin by *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *J. Oral Pathol. Med.* **39**, 275–278 (2010)
56. Parra-Ortega B., Cruz-Torres H., Villa-Tanaca L., Hernández-Rodríguez C.: Phylogeny and evolution of the aspartyl protease family from clinically relevant *Candida* species. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **104**, 505–512 (2009)
57. Pfaller M.A., Diekema D.J.: Epidemiology of Invasive Candidiasis: a Persistent Public Health Problem. *Clin. Microbiol. Rev.* **20**, 133–163 (2007)
58. Pichova I., Pavličková L., Dostal J., Dolejší E.: Secreted aspartyl proteases of *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* and *Candida lusitanae*. *Eur. J. Biochem.* **268**, 2669–2677 (2001)
59. Ramage G., Savige S.P., Thomas D.P., López-Ribot J.L.: *Candida* Biofilms: an Update. *Eukaryot. Cell*, **4**, 633–638 (2005)
60. Ramage G., VandeWalle 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. Lett.* **214**, 95–100 (2002)
61. Ramsook C.B., Tan C., Garcia M.C., Fung R.: Yeast Cell Adhesion Molecules Have Functional Amyloid-Forming Sequences. *Eukaryot. Cell*, **9**, 393–404 (2010)
62. Rüping M., Vehrechild J.J., Cornely O.A.: Patients at High Risk of Invasive Fungal Infection. *Drugs*, **68**, 1941–1962 (2008)
63. Salvino R.M., Dechicco R.S., Seidner D.L.: Perioperative nutrition support: Who and how. *Cleve. Clin. J. Med.* **71**, 345–351 (2004)
64. Samaranyake Y.H., Dassanayake R.S., Cheung B.P., Jayatilake J.A.: Differential phospholipase gene expression by *Candida albicans* in artificial media and cultured human oral epithelium. *AMPIS*, **114**, 857–866 (2006)
65. Segal E.: *Candida*, still number one—what do we know and where are we going from there. *Mikol. Lek.* **11**, 133–138 (2004)
66. Senevirante C.J., Jin L.J., Samaranyake Y.H., Samaranyake L.P.: Cell Density and Aging as Factors Modulating Antifungal Resistance of *Candida albicans* Biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**, 3259–3266 (2008)
67. Shin J.H., Kee S., Shin M.G., Kim S.H.: Biofilm Production by Isolates of *Candida* Species Recovered from Nonneutropenic Patients: Comparison of Bloodstream Isolates with Isolates from Other Sources. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 1244–1248 (2002)
68. Silva S., Henriques M., Oliveira R., Azeredo J.: Characterization of *Candida parapsilosis* infection of an in vitro reconstructed human oral epithelium. *Eur. J. Oral Sci.* **117**, 669–675 (2009)
69. Słodkowski M., Cebulski W., Deptała A., Krasnodębski I.W.: Zakażenia grzybicze u chorych żywionych poza- i dojelitowo. *Zakażenia*, **4**, 45–49 (2004)
70. Srikantha T., Tsai L.K., Daniels K., Soll D.R.: *EFG1* Null Mutants of *Candida albicans* Switch but Cannot Express the Complete Phenotype of White-Phase Budding Cells. *J. Bacteriol.* **182**, 1580–1591 (2000)
71. Sudbery P., Gow N., Berman J.: The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends Microbiol.* **12**, 317–324 (2004)
72. Swindell K., Lattif A.A., Chandra J., Mukherjee P.K., Ghannoum M.A.: Parenteral Lipid Emulsion Induces Germination of *Candida albicans* and Increases Biofilm Formation on Medical Catheter Surfaces. *J. Infect. Dis.* **200**, 473–480 (2009)
73. Tavanti A., Pardini G., Campa D., Davini P., Lupetti A., Senesi S.: Differential Expression of Secretory Aspartyl Proteinase Genes (*SAP-10*) in Oral *Candida albicans* Isolates with Distinct Karyotypes. *J. Clin. Microb.* **10**, 4726–4734 (2004)

74. Thewes S., Moran G.P., Magee B.B., Shaller M.: Phenotypic screening, transcriptional profiling and comparative genomic analysis of an invasive and non-invasive strain of *Candida albicans*. *BMC Microbiol.* **8**, 187–203 (2008)
75. Trofa D., Gacser A., Nosanchuk J.D.: *Candida parapsilosis* an Emerging Fungal Pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* **21**, 606–625 (2008)
76. Vidotto V., Ponton J., Aoki S., Quindos G.: Differences in extracellular enzymatic activity between *Candida dubliniensis* and *Candida albicans* isolates. *Rev. Iberoam. Micol.* **21**, 70–74 (2004)
77. Wang Y.: CDKs and the yeast-hyphal decision *Curr. Opin. Microbiol.* **12**, 644–649 (2009)
78. Weig M., Jänsch L., Groß U., De Koster C.G., Klis F.M.: Systemic identification in silico of covalently bound cell wall proteins and analysis of protein-polysaccharide linkages of the human pathogen *Candida glabrata*. *Microbiology*, **150**, 3129–3144 (2004)
79. Whiteway M., Bachewich C.: Morphogenesis in *Candida albicans*. *Annu. Rev. Microbiol.* **61**, 529–553 (2007)
80. Yang Y.L.: Virulence factors of *Candida* species. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* **36**, 223–228 (2003)
81. Zaugg C., Borg-von Zepelin M., Reichard U., Sanglard D., Monod M.: Secreted Aspartic Proteinase Family of *Candida tropicalis*. *Infect. Immun.* **69**, 405–412 (2001)
82. Zhao V.M., Griffith D.P., Blumberg H.M., Dave N.J., Battey C.H., McNally T.A., Easley K.A., Galloway J.R., Ziegler T.R.: Characterization of post-hospital infections in adults requiring home parenteral nutrition. *Nutrition*, **29**, 52–59 (2013)
83. Zhu W., Filler S.G.: Interactions of *Candida albicans* with epithelial cells. *Cell. Microbiol.* **12**, 273–282 (2010)