

CZU: 579.61

BIOFILMELE FUNGICE – PROVOCARE ACTUALĂ LA NIVEL MONDIAL*Olga BURDUNIUC**Agenția Națională pentru Sănătate Publică,
Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”*

În prezenta lucrare sunt analizate cele mai relevante publicații din literatura medicală selectate printr-o cercetare utilizând bazele de date PubMed, EMBASE, HINARI și site-urile web ale OMS, CDC privind unul dintre factorii de virulență a fungilor precum formarea biofilmelor. Scopul acestui review este de a furniza informație științifică actuală referitoare la acest subiect. Au fost revizuite un șir de studii și s-a constatat că ambele tipuri de fungi – atât levuriformi, cât și filamentoși – pot adera la suprafețe biotice și abiotice, dezvoltându-se în comunități extrem de organizate, rezistente la preparatele antimicotice și la factorii de mediu.

Cuvinte-cheie: *fungi, biofilme, persistență, rezistență la antimicotice.*

FUNGAL BIOFILMS – CURRENT CHALLENGE WORLDWIDE

This paper is a literature review that analyzes the most relevant publications in the medical literature, selected through a search in databases such as PubMed EMBASE, HINARI, WHO and CDC websites regarding one of the fungal virulence factors - biofilm formation. The purpose of this review is to provide up-to-date scientific information on this topic. In carrying out these objectives, a series of studies were reviewed and it was found that both yeasts and filamentous fungi can adhere to biotic and abiotic surfaces, developing in highly organized communities, resistant to antifungal drugs and environmental factors.

Keywords: *fungi, biofilms, persistence, resistance to antifungals.*

Introducere

Biofilmele microbiene constituie în prezent o problemă de sănătate publică care afectează populația din toate țările, indiferent de gradul de dezvoltare al acestora.

Conceptul de biofilm reprezintă o nouă paradigmă în microbiologie: 99% din bacteriile de pe Terra trăiesc asociate în consorții complexe, atașate suprafețelor, iar abordarea lor indică noi perspective de cercetare [1,2].

Studiul biofilmelor devine astfel un domeniu interdisciplinar și multidisciplinar, antrenând microbiologi, ingineri, medici, ecologi, specialiști în evoluționism, microscopie, geneticieni, chimiști, fizicieni, matematicieni, ingieniști, toxicologi din întreaga lume [3,4].

Biofilmele au subminat granița biologică între eucariote și procariote [5]. Aceste consorții reprezintă niște structuri complexe de microorganisme legate în mod ireversibil de suprafețe solide inerte sau vii și înconjurate de o matrice polimerică organică amorfă, fiind o secreție extracelulară a microorganismelor – substanțe polimerice extracelulare. Autorii studiilor definesc biofilmul microbial ca o structură tridimensională care aderă atât la suprafețele vii, cât și la cele inerte, fiind constituită din agregate de celule microbiene (proteine și ADN) încorporate într-o matrice polimerică, extracelulară, exopolizaharidică, autosecretată [6,7].

Aderarea microorganismelor la o suprafață și dezvoltarea biofilmului reprezintă una dintre „strategiile” de supraviețuire a acestora la acțiunea factorilor de mediu. În natură biofilmele sunt răspândite pretutindeni fiind constituite din bacterii, protozoare, actinomicete, ciuperci și alge microscopice aflate în relații de mutualism și comensalism, care se exprimă prin cooperarea reciproc avantajoasă pentru consorți, cu referire la hrană, apă, protecție, transport etc. [8].

Natura prezintă biofilmele, adesea multispecifice, de aceea această formă de existență a fost studiată pe larg în ultimul timp. Cercetătorii au evidențiat în structura biofilmelor agenți microbieni cu expresie genetică și fenotipică și rată de multiplicare diferită de ale celor aflați în stare planctonică. Biofilmele sunt considerate ca un stil de viață universal pentru supraviețuirea microbilor în acțiunea preparatelor antimicotice și predomină în natură comparativ cu celulele planctonice [9,10].

Biofilmele au fost studiate pe larg în ultimul timp și s-a demonstrat implicarea acestora în dezvoltarea unui spectru larg de maladii infecțioase, inclusiv fungice. Totodată, biofilmelor le datorăm atât rezistența la antimicrobiene, mecanisme de apărare a organismului, precum și persistența portajului [10].

Implicarea biofilmelor microbiene în apariția infecțiilor persistente și evoluția microorganismelor rezistente la antimicrobiene este astăzi o certitudine. Biofilmele fungice au fost raportate a fi de până la 1000 de ori mai rezistente la antifungice decât celulele planctonice, dar mecanismul acestei rezistențe rămâne neclar [10–12].

Studiile recente subliniază că o bună parte din patologia infecțioasă este generată și/sau întreținută de biofilme, acestea fiind implicate în cel puțin 60% din totalul cazurilor de infecții cronice sau recurente [12].

Celulele persistente din biofilme formează cel puțin 1% din populație. Acestea sunt celule latente, care asigură supraviețuirea chiar și după un curs extensiv și pe termen lung de terapie antifungică, acest aspect și duce la recurență și recidivă [14].

Fungii formează biofilme pentru cooperare metabolică, dobândirea de noi trăsături genetice și creșterea rezistenței la factorii de mediu. Actualmente se atestă creșterea ponderii infecțiilor fungice. Medicina modernă a furnizat fungilor multe nișe, cum ar fi catetere, șunturi, tuburi, implanturi, lentile de contact, proteze și dispozitive protetice. Dispozitivele sunt colonizate de fungi și formează biofilme pe suprafețele abiotice [12,15].

Biofilmele au fost în atenția multor savanți renumiți, care descriu procesul de formare a acestora într-o manieră secvențială: (a) *aderența și adsorbția*. Fixarea inițială: începe cu o atașare reversibilă de o suprafață a microorganismelor. Acești primii coloniști aderă slab la suprafață, legându-se prin forțe Van der Waals. Atașarea ireversibilă: dacă coloniștii nu sunt îndepărtați imediat de pe suprafață, ei se pot ancora mai ferm, folosindu-se de structurile de adeziune celulară, cum sunt pilii; (b) *stadiul intermediar* (maturizarea I) are o activitate metabolică maximă. Matricea polimerică extracelulară (PME) fiind îmbunătățită, reprezintă sursa de nutrienți și protejează comunitatea biofilmelor de desicare, radiații ultraviolete, celulele imune și antimicrobiene; (c) *stadiul de maturizare (I, II)*. Primii coloniști facilitează sosirea altor celule prin furnizarea diverselor situsuri de adeziune, prin începerea construcției matricei care ține unit biofilmul. Câteva specii nu sunt capabile să se atașeze prin suprafețele lor, dar adesea sunt capabile să se ancoreze la matrice sau direct la primii coloniști. În timpul colonizării aceste celule sunt capabile să comunice prin „molecule semnal” – *quorum sensing* sau folosind produși ca lactonele homoserin acilate. În a doua fază de maturizare, biofilmul crește prin combinația dintre diviziunea celulară și recrutarea de noi celule, procesul de formare a biofilmului este stabil și se poate modifica numai în formă și dimensiune; d) *etapa de eliberare și diseminare de celule din colonia biofilmului*. Aceasta etapă permite biofilmelor să se răspândească și să colonizeze noi suprafețe, constituind o etapă esențială a ciclului de viață al biofilmelor [16–18].

Formarea biofilmului nu este un factor clasic de virulență. Cu toate acestea, biofilmele conduc la creșterea patogenității, deoarece comunitatea celulelor devine prea mare pentru a fi fagocitată. Fungii din biofilme sunt mai rezistenți la stres oxidativ, iar PME afectează recunoașterea epitopilor fungici de suprafață de către celulele imune [17].

Biofilmele formate de fungi sunt subiectul unui șir de cercetări demonstrând implicarea celor mai importanți fungi din punct de vedere medical în formarea biofilmelor, precum *Candida*, *Aspergillus*, *Cryptococcus*, *Trichosporon*, *Coccidioides*, *Pneumocystis*. Biofilmele fungice au implicații notabile din punct de vedere clinic și reprezintă o formă specifică de creștere microbiană și veriga principală în dezvoltarea infecțiilor fungice [19–24].

Studiile realizate în ultimul deceniu au listat principalele caracteristici ale biofilmelor fungice importante pentru evoluția infecțiilor invazive: desprinderea agregatelor de biofilme, care pot genera infecții de flux sangvin sau embolii, schimbul intercelular de plasmide ce este implicat direct în transmiterea rezistenței antimicrobiene, microbii din biofilm sunt protejați de acțiunea antimicrobiană, biofilmele nu sunt afectate de clearance-ul sistemului imun al gazdei [25].

Formarea biofilmelor de către tulpinile relevante clinic pe endoproteze, catetere, suprafața dispozitivelor medicale, ventilatoarelor mecanice, precum și măsurile de combatere a formării acestora au fost descrise într-un șir de cercetări din ultima perioadă. Alți cercetători descriu consecințele clinice semnificative ale infecției asociate cu biofilmele mature. Astfel, tratamentul antimicrobian de durată este adesea necesar pentru eradicarea acestor infecții (osteomielita, endocardita etc.); din păcate, chiar și această strategie de multe ori eșuează, necesitând excizia chirurgicală a biofilmului contaminant [25–27].

Savanți din diferite țări cu puternic potențial de cercetare au semnalat necesitatea și urgența studiilor privind elucidarea aprofundată a biofilmelor și a celor de dezvoltare a strategiilor eficiente de prevenire a formării biofilmelor și/sau de tratamente pentru infecțiile cauzate.

Material și metode

Lucrarea analizează cele mai relevante publicații din literatura medicală din țară și de peste hotarele ei utilizând bazele de date PubMed, EMBASE, Scopus, HINARI, Google Academic și site-urile web ale orga-

nizațiilor internaționale în domeniu. Pentru elucidarea acestui subiect au fost revizuite și sistematizate 98 de surse bibliografice, informațiile publicate în ultimele decenii. În procesul de analiză au fost excluse 5 articole vechi care nu s-au găsit a fi sugestive. Astfel, în final au fost selectate 87 de publicații actuale și relevante, 6 articole mai vechi dar foarte demonstrative (în total 93 de lucrări științifice) privind structura, compoziția, mecanismele de formare, factorii ce influențează formarea și înlăturarea biofilmului.

Rezultate și discuții

Istoricul biofilmelor și gradul de investigare a problemei la momentul actual

Microorganismele au fost descrise sub formă planctonică și caracterizate pe baza proprietăților lor culturale, percepția clasică a microorganismelor unicelulare. Van Leewenhoek a fost primul savant care a descris fenomenul prin care aceste microorganisme aderă și se multiplică pe majoritatea suprafețelor, atât cele exterioare, cât și în organism, dând naștere biofilmului [2].

Termenul „biofilm” a fost introdus de Costerton în 1985. Autorul a definit biofilmul drept „o comunitate sesilă microbială caracterizată prin celule care sunt atașate ireversibil de un substrat sau una de cealaltă, într-o matrice de substanță polimerică extracelulară și prezintă un fenotip modificat în raport cu rata de creștere și transcripția genelor” [28].

Primele biofilme au fost descrise în secolul al XIX-lea pe plăci dentare, apoi fibroza chistică a oferit modele de biofilme viabile, cu status sesil, fixat permanent sau temporar de substrat, constituind comunități celulare, comparative cu cele planctonice ce nu aveau la suprafață [11, 29].

În alte studii se subliniază că biofilmele au devenit un domeniu de studiu începând cu sfârșitul anilor șaptezeci, când aceste structuri au fost aduse în atenția publicului de Bill Costerton și colaboratorii în 1978 [30].

Din acea perioadă până în prezent au apărut numeroase articole științifice, monografiile ce abordează problema privind formarea biofilmelor și o parte din ele vor fi prezentate în prezenta lucrare. Interesul sporit al cercetătorilor față de biofilme se explică prin semnificația medicală, ecologică, biotehnologică și teoretică a fenomenelor de aderență și agregare microbială.

Unele particularități ale biofilmelor formate de fungi din genul Candida

Evidențele publicate privind biofilmelor fungice atestă o predominare a speciilor din genul *Candida* în etiologia patologiei infecțioase de origine micotică. Speciile genului *Candida*, reprezentant ai microflorei comensale, frecvent sunt implicate și în patologia infecțioasă. Dispozitive de tip: stent, șunt, proteze, implante sonde endotraheale, catetere etc., sunt frecvent colonizate de aceste tulpini și reprezintă surse pentru dezvoltarea de biofilme candidozice. Practic ultimul deceniu a cunoscut o creștere exponențială a infecțiilor de flux sangvin cauzate de *Candida* spp. (predominant *Candida albicans*), în paralel cu utilizarea pe scară tot mai largă a dispozitivelor mai sus amintite, astfel încât în acest moment fungii (și în special *Candida albicans*) reprezintă cea de-a treia cauză de infecții de cateter, soldate cu rată înaltă de mortalitate [12].

În colonizarea suprafețelor celulele fungice trebuie să adere la o suprafață hidrofobă a unui biomaterial, aspect mediat de forțele electrostatice, dar și adevine fungice, ce recunosc liganzi din suprafața de aderat (fibrinogen, fibronectină) etc. [53,56].

Biofilmele *C. albicans* sunt formate pe diverse suprafețe abiotice și biotice [31–33,43]. Alte specii de *Candida*, incluzând *C. tropicalis*, *C. parapsiloză* și *C. glabrata*, formează biofilme care conțin ECM, dar nu produc o hifă adevărată. Totodată, aceste specii pot coagrega bacterii, cu formarea de biofilme polimicrobiene: bacteriene și fungice. Aderarea celulelor la un substrat este urmată de diviziune celulară, proliferare și dezvoltarea biofilmului, structură tridimensională complexă, cu aranjament spațial optim pentru transportul nutrienților și eliminarea deșeurilor [35].

Studiile analizate demonstrează implicarea biofilmelor formate de microorganismele din genul *Candida* la bolnavi cu dispozitive implantabile (proteze valvulare, endovasculare, articulare, dar, mai ales, catetere venoase centrale). Autorii subliniază că pătrunderea acestora în circulația sistemică constituie adesea puncte de plecare pentru infecții micotice invazive [12, 33, 43].

Cercetările evidențiază în dezvoltarea biofilmelor de *Candida* spp. unele particularități, aderarea celulelor fungice fiind urmată la 3-6 ore de formarea structurilor tubulare. După o incubare de 24-48 ore biofilmele maturate de *Candida albicans* dispun de o rețea densă de celule fungice, hife și pseudohife și matrice polimerică extracelulară. Dat fiind faptul că filamentarea nu a fost descrisă la formele planctonice, este posibil ca acest aspect să fie favorizat de formarea biofilmului. Microscopia electronică a permis vizualizarea de canale hidrice ramificate în biofilm, cu dimensiuni de 25-450 μm [36].

Capacitatea de a se transforma reversibil din celule fungice în filamente a celulelor de *C. albicans* (conversia morfogenetică) are rol decisiv în dezvoltarea biofilmului. Autorii studiilor axate inclusiv pe conversia morfogenetică denotă că hifele constituie elemente esențiale pentru integritatea structurală, arhitectura multistratificată ce caracterizează biofilme maturate [37].

Ramage și col. au demonstrat că substratul molecular al filamentării celulelor de *Candida* și dezvoltării biofilmelor mature, înalt structurate, este asigurat de prezența proteinei Efg1 [38].

Majoritatea studiilor analizate subliniază rolul decesisiv al comunicării intercelulare (quorum sensing-QS) în procesul de formare a biofilmului. QS controlat de proteina de transducție Chk1p asigură monitorizarea multiplicării celulare pentru a evita suprapopularea, dar și competiția pentru nutrienți, cu implicații serioase pentru procesul infecțios, în special în diseminarea infecției și apariția de emboli septici la distanță. Un exemplu interesant de comunicare intercelulară în biofilm este dat de interacțiunea *Candida albicans* și *Pseudomonas aeruginosa*. Celulele de *Pseudomonas* formează un biofilm extrem de dens pe filamentele de *Candida* și distruge fungii, dar bacteriile nu distrug formele celulare de *Candida*. Totodată, celulele de *Candida* spp. pot stopa filamentarea ca răspuns la expunerea contactului cu molecule de comunicare cu *Pseudomonas* de tip 3-oxo-C12homoserin lactonă. Studiile demonstrează că morfogeneza *Candidaei albicans* se află sub controlul mediului înconjurător al biofilmului [39–41].

Arhitectura biofilmului fungic patogen

Dezvoltarea arhitecturii biofilmelor este în mare măsură legată de producerea matricei polimerice extracelulare (MPE) de către microorganismele. MPE reține apa și nutrienții obținuți din materialele matricei hidrolizate de enzimele produse de microorganismele [12,42].

Prin urmare, matricea include toate elementele biofilmului și este compusă în principal din apă (până la 97%), polimeri polizaharidici secretați de microorganismele și produse de degradare a substanțelor din mediul extern și alte componente, cum ar fi ADN, ARN și lipide. Spre deosebire de culturile clasice de microorganismele din mediile lichide agitate, biofilmul nu este un mediu omogen, deoarece prezintă zone cu conținut variabil de oxigen și nutrienți, pH diferit [42–44].

Regiunile din centrul agregatelor bacteriene sunt în general anaerobe și sărace în nutrimente, în timp ce cele situate în vecinătatea canalelor sau la interfața dintre biofilm și lichid sunt mai bine oxigenate și mai bogate în nutrienți [45].

Biofilmul este acoperit în întregime de MPE, astfel protejează și oferă o structură ideală pentru coeziunea și adeziunea celulelor [42]. Cea mai relevantă funcție din punct de vedere medical a matricei extracelulare este capacitatea sa de a oferi o barieră fizică între celulele de biofilm și sistemul imunitar și adesea medicamentele utilizate pentru tratament [46].

MPE este autoprodusă și poate conține proteine, polizaharide, lipide, acizi nucleici și alte molecule care pot interacționa între ele și cu suprafața celulei pentru a forma o rețea rigidă de protecție [47]. Compoziția MPE variază în funcție de specii și chiar de condiții de creștere; cu toate acestea, pentru multe biofilme compoziția MPE rămâne necunoscută [42,48].

Funcțional, MPE poate servi drept barieră protectoare împotriva agenților antimicrobieni, chimici și biologici, inclusiv către preparate antimicotice prescrise [48,49].

Biofilmele, fiind populații complexe de celule asociate suprafeței înglobate într-un MPE, posedă fenotipuri distincte în comparație cu omologii lor celulari planctonici. Elementele nutritive, moleculele sensibile la cvarum și contactul cu suprafața sunt factori favorizanți. Biofilmele de *C. albicans* sunt constituite în principal din celule sub formă de levuri și hife, ambele fiind necesare pentru formarea biofilmului [19].

MPE se acumulează pe măsură ce biofilmul se maturizează și contribuie la coeziune [50]. Biofilmele de *Aspergillus* se pot forma atât pe suprafețele abiotice, cât și pe cele biotice. Celulele inițiale colonizatoare care aderă la substrat sunt conidiile. Micelia (forma hifală) se dezvoltă pe măsură ce biofilmul se maturizează [51].

MPE care încheagă biofilmul a fost observat *in vitro* și *in vivo*. Organizarea hifală este diferită în cele două forme ale infecției cu biofilm de *A. fumigatus*: infecțiile cu aspergillom prezintă o minge de hife interconectate; infecțiile cu aspergiloză prezintă hife separate individuale [42,51,52].

Hifele *C. albicans* și *A. fumigatus* pot forma pori sau canale pe suprafețe biotice [43,75]. Patogenul fungic emergent *T. asahii* formează biofilme compuse din levuri și celule hifale încorporate în matrice, la fel ca cele ale *Coccidioides immitis* [22,53–55].

C. neoformans formează biofilme constând din celule de drojdie pe multe substraturi abiotice, iar polizaharidul capsular sintetizat formează ECM. Cu toate că *C. neoformans* formează hifa în cursul grupării, până în prezent nu s-au observat hife în biofilmele de *C. neoformans* [21].

În mod similar, speciile *Pneumocystis* nu produc structuri hifale ca parte a biofilmelor lor. Astfel, formarea hifală nu este o caracteristică uniformă a biofilmelor fungice [24].

Comunicarea intercelulară prin semnale (quorum sensing - QS)

În biofilme QS este gândit să joace un rol în producția de biofilme sănătoase și pe deplin dezvoltate. Aceste complexe microbiene definesc structuri multistratificate arhitectural formând comunități bacteriene relativ stabile ce trăiesc în sesile într-un mediu protejat [28, 56–59].

Comunicarea intercelulară, este legată de mecanismul prin care microorganismele comunică și își coordonează comportamentul prin secreția de molecule de semnalizare [60,61].

Sistemele QS par să fie implicate în toate etapele de formare a biofilmelor. Ele reglează densitatea populației și activitatea metabolică în biofilmul matur pentru a se potrivi cu cerințele nutriționale și resursele disponibile. Bacteriile care locuiesc în biofilme au programe semnificativ diferite de transcripție față de bacteriile planctonice vii libere ale aceleiași tulpini. Dovezi recente privind *Streptococcus pneumoniae* indică faptul că organismele existente într-o stare sesilă în biofilm sunt mai în măsură să stabilească infecții localizate (de exemplu, în țesutul pulmonar) decât microorganismele izogenice într-o stare planctonică fiziologică [62–65].

QS joacă rol în mai multe mecanisme, inclusiv dezvoltarea biofilmului, morfogeneza, limitarea populației celulare și, în special, pentru diseminarea procesului infecțios [61,63]. Detectarea QS este de o importanță fundamentală și este datorată rolului specific ce îl determină în fiziologia biofilmului. Celulele persistente reprezintă o mică subpopulație de celule care intră spontan într-o stare latentă ce nu divizează. Atunci când o populație este tratată cu antimicrobiene, celulele normale pier, în timp ce cele persistente supraviețuiesc. În cazul în care terapia este întreruptă, celulele persistente pot reface biofilmele, inducând recurența infecțiilor [66].

Mecanismele moleculare care promovează rezistența antifungică în biofilmele fungice nu sunt complet elucidate. Unele studii au arătat că pompele de eflux contribuie la dezvoltarea rezistenței față de azoli numai în faza inițială a formării biofilmului. În plus, conținutul de sterol în membrană contribuie la rezistența anti-azoli, ce apare în timpul fazelor intermediare și mature [67].

Conform Soto și col., reglarea pompelor de eflux medicamentos determină, de asemenea, rezistența la antimicrobiene la majoritatea microorganismelor ce formează biofilm [68].

Aceste pompe sunt împărțite în două grupuri: primul este legat de transportoarele- casetă ATP-ligande codificate de genele CDR, în timp ce al doilea este compus din facilitatorul principal codificat de genele MDR [49].

Activarea pompelor de eflux are loc prin „expulzarea” preparatelor antifungice după contactul cu biofilmul. Totodată, crește expresia genelor CDR1 și MDR1, care a fost corelată cu rezistența fungilor la azoli. Unele studii privind rezistența la biofilm demonstrează expresia înaltă a genelor pompei de eflux în primele ore de formare a biofilmului [49].

Semnificația biofilmelor în dezvoltarea rezistenței antifungice

Majoritatea cercetărilor descriu rezistența antifungică a biofilmelor ca un fenomen complex multifactorial cu multe aspecte neelucidate.

Microorganismele din structura biofilmelor își încetinesc rata de multiplicare, ceea ce face mai greu de distrus de antimicrobiene. Prezența microorganismelor facilitează dezvoltarea matricei polimerice care protejează microbii din fluxul sangvin de acțiunea preparatelor antifungice. În același timp, se atestă modificări de comportament microbial tipice germenilor din biofilm și faptul că majoritatea acestora suferă de modificări la nivelul genelor (de tip up- sau down-regulation) caracteristice fiecărei clase în parte, evidențiază că biofilmele reprezintă o modalitate de creștere a rezistenței antimicrobiene și se conturează ca o problemă de sănătate publică, mai ales pentru bolnavul critic și pentru cel cu imunodepresie severă de diverse cauze [69].

În biofilm, este facilitat transferul de ADN extracromozomial (plasmide) între celule, element care de asemenea favorizează apariția și răspândirea rezistenței antimicrobiene. Agregatele de biofilm se pot desprinde și celulele microbiene își pot relua rapid proprietățile planctonice sau de aderare la alte suprafețe. În ambele situații, aceste structuri posedă potențial de a transfera la distanță și genele de rezistență antimicrobiană. Astfel, după cum a fost evidențiat și de alți savanți, microorganismele din structura biofilmului sunt o populație cu metabolism diferit de al celor în stare planctonică și pot declanșa infecții grave [70].

Totodată, aglomerările de celule ce formează biofilme sunt mult mai rezistente la preparatele antifungice decât celulele planctonice. Factorii care contribuie la acest fenomen includ complexitatea structurală a biofilmului, prezența matricei extracelulare (ECM), heterogenitatea metabolică intrinsecă a biofilmelor și reglarea asociată genelor generatoare de biofilm cu efect asupra pompei de eflux. Nivelul de rezistență variază în dependență de preparatul antifungic și specia de micete [70–72].

Evidențele în acest domeniu subliniază că modificările sau supraexpresia moleculelor țintă, extruzarea activă prin pompe de eflux, difuzia limitată, rezistența și comunicarea intercelulară (quorum sensing) și matricea polimerică extracelulară sunt mecanisme caracteristice fungilor pentru combaterea efectelor tratamentului antimicrobic [72, 73].

MPE este produsă de celulele aderente, constituind o barieră în difuziunea antifungicelor. Studiile denotă că, în unele cazuri, MPE poate contribui la rezistența antifungică prin legarea la antifungice, împiedicând astfel accesul la suprafața țintei dorite sau la celulele fungice [74].

Actualmente o provocare aparte reprezintă dovezile științifice insuficiente privind rezistența la antifungice a acestor biofilme. Majoritatea standardelor internaționale existente permit testarea formelor planctonice, dar nu și estimarea sensibilității antifungice pentru celulele din biofilme. Acest aspect ar putea fi o explicație pentru discrepanța dintre investigațiile de laborator și evoluția clinică a acestor infecții [75]. Actualmente există puține studii ce descriu astfel de metodologii, iar în unul dintre ele se propune folosirea microplăcilor pe care se formează biofilme, ce sunt expuse ulterior la diverse antifungice. Biofilmele de *Candida* spp. sunt descrise de un șir de autori ca una dintre cauzele evoluției rezistenței antifungice. Este îmbucurător faptul că antifungice noi, cum ar fi echinocandinele și forma liposomală a Amfotericinei B, au dovedit acțiunea fungicidă pentru microorganismele din biofilme [76].

Celulele planctonice depind de modificări genetice ireversibile pentru a menține un fenotip rezistent, în timp ce biofilmele persistă din cauza prezenței lor fizice și a densității populației, oferind un fenotip rezistent aproape indus, indiferent de modificările genetice definite [77,78].

Mai mulți factori ai mediului, inclusiv pH-ul, temperatura, disponibilitatea oxigenului și alții, modifică arhitectura biofilmului și susceptibilitatea antifungică [79].

Rezistența intrinsecă a biofilmelor de *Candida* presupune diferite mecanisme: densitatea celulară mare a biofilmului, reducerea ratei multiplicării și limitarea nutrienților, activitatea matrice polimerice extracelulare, expresia genelor responsabile de rezistență (în special a celor care codifică pompele de eflux) etc. [80].

Chandra și col. au demonstrat că intensitatea ratei metabolice a biofilmului este corelată cu creșterea rezistenței antifungice. Reducerea semnificativă a cantității de ergosterol din biofilme în fazele intermediară și de maturitate, face ca majoritatea antifungicelor care au mecanism fungicid (interferența cu metabolismul steroizilor) să reducă eficiența acestora [81].

Candida parapsilosis este relativ rezistentă la fluconazol, amfotericină B, nistatină, voriconazol și altele. Biofilmele *Aspergillus fumigatus* sunt relativ rezistente la itraconazol și, într-o oarecare măsură, la caspofungină. Biofilmele criptococice nu sunt afectate de fluconazol și voriconazol, iar biofilmele de *Trichosporon asahii* prezintă o rezistență crescută la amfotericină B, caspofungin, voriconazol și fluconazol. Terapiile cu azoli și amfotericină B sunt ineficiente împotriva biofilmelor de *Pneumocystis carinii*. Mecanismele de rezistență asociate biofilmului au fost caracterizate pentru *C. albicans* și *A. fumigatus* și includ legarea medicamentelor prin MPE și producerea de celule persistente. Aceste mecanisme se pot referi și la alți fungi [20,82–84].

Antifungicele nu reușesc să acționeze eficient, deoarece există un gradient de mediu (heterogenitate) în cadrul biofilmelor. Aceste biofilme fiind după structură asemănătoare cu fungii duc la formarea gradientului de concentrație sub formă de gradient de oxigen chimic, pH sau gradient de nutrienți. Diferite concentrații de antimicrobiene ating diverse celule individuale în diferite straturi de biofilme. Această concentrație suboptimă acționează ca stimul pentru formarea suplimentară a biofilmului și, de asemenea, duce la dezvoltarea rezistenței la antimicrobiene [85].

Alte mecanisme implicate în rezistența la antimicrobiene sunt: densitatea celulară crescută, modificarea țintelor medicamentoase și reglarea pompelor de eflux pe măsură ce biofilmele se maturizează. MPE se manifestă ca o barieră fizică și împiedică pătrunderea preparatelor antifungice în interiorul biofilmului. Există o concentrație crescută de substanțe, cum ar fi beta-glucanii și mananele, în MPE, care acționează ca „bureți medicamentoși” și sechestrează azolii, pirimidinele sau polienele. MPE conține ADN extracelular. Dacă se adaugă AND-aze la modelele de biofilm, CMI-ul antifungicelor scade semnificativ [73,86].

Noi strategii alternative de control al biofilmelor

Majoritatea studiilor analizate propun noi strategii alternative de control al biofilmelor microbiene, precum sunt compușii biologici cu proprietăți antibacteriene și antibiofilme. Există foarte puține preparate antimicotice ca opțiuni împotriva formelor de fungi încadrate în biofilm; printre ele se enumeră amfotericina B și echinocandinele. Prin urmare, este nevoie de mai mulți agenți, care pot inhiba aderența la biofilm sau pot elimina sau perturba biofilmul deja format [87].

Civilizațiile antice au lăsat informații scrise legate de utilizarea produselor naturale în terapia bolilor infecțioase. Cel mai vechi document scris datează de acum 4000 de ani, acesta conține informații ce prevăd remediarea diverselor boli. Totodată, cercetarea metaboliților biologici activi secundari pentru aplicații folosite este departe de a fi considerată nouă [88, 89, 90].

La moment au fost identificate mai multe ținte noi sub formă de componente ale MPE. Multe extracte vegetale, nanoparticule de argint, oxid nitric, chitosan etc. au fost încercate pentru a preveni formarea biofilmului pe suprafețele cateterelor și dispozitivelor intravasculare [91].

Avantajul produselor naturale este dezvoltarea și perfecționarea continuă, de-a lungul milioanelor de ani de presiune evolutivă, pentru a ajunge puternice din punct de vedere biologic. Substanțele obținute natural, comparativ cu cele artificiale, posedă potențial de biodegradare mult mai înalt și rapid, fiind acceptate pe piață mult mai ușor din punct de vedere ecologic [88].

Produsele naturale sunt remarcabile prin diversitatea structurii și activității biologice, în contrast cu substanțele produse de industria farmaceutică, ce utilizează metode sintetice, care rareori prezintă o activitate puternică și diversificată biologic [92].

Aceste ipoteze se bazează pe diversitatea și capacitatea microorganismelor de a se adapta și, prin urmare, acestea reușesc să degradeze majoritatea substanțelor naturale. Istoric de mii de ani, produsele naturale au jucat un rol foarte important în fortificarea sănătății și prevenirea bolilor infecțioase [93].

În pofida faptului că până la moment există multe studii ce țin de activitatea antimicrobiană a extractelor vegetale asupra microorganismelor rezistente, totodată relativ puține din ele s-au dovedit a fi suficient de active și inofensive pentru organismul uman.

Autorii acestui reviu subliniază necesitatea studiilor suplimentare privind metodele alternative de obținere a preparatelor cu acțiune antifungică, naturale, ecologic standardizate, inofensive.

Concluzii

1. Biofilmele sunt omniprezente, aproape fiecare specie de microorganisme are mecanismele prin care acestea pot adera la suprafețe vii sau non-vii; ele pot fi răspândite pretutindeni în natură.
2. Majoritatea biofilmelor fungice sunt responsabile de infecții foarte rezistente la antimicrobiene, constituind o preocupare serioasă a serviciilor de sănătate publică, prin creșterea duratei de spitalizare, ratei de mortalitate și a impactului asupra economiei naționale și globale.
3. Actualmente, pe plan mondial sunt disponibile noi strategii alternative de control al biofilmelor, cum ar fi: substanțe biologice active de origine vegetală, enzime și bacteriofagi. Aceste studii sunt la etapa inițială, de cercetare *in vitro*, și necesită studii clinice aprofundate.
4. În final transmitem recomandări cercetătorilor privind necesitatea studiilor ce țin de identificarea soluțiilor eficiente pentru prevenirea și controlul infecțiilor cauzate de biofilm.

Referințe:

1. COSTERTON, J.W., CHENG, K.J., GESSEY, G.G., LADD, T.I., NICKEL, J.C., DASGUPTA, M., MARRIE, T.J. Bacterial biofilms in nature and disease. In: *Annual Reviews in Microbiology*. 1987, no.41, p.435-464. eISSN 1545-3251
2. McCARTY, S., WOODS, E., PERCIVAL, S.L. *Biofilms: from Concept to Reality*. Elsevier Inc., 2014.
3. COSTERTON, J.W., WILSON, M. Introducing biofilms. *Biofilms*. In: *Cambridge University Press, UK*, 2004, p.1-4. ISBN 0-521-66275-3.
4. WEST, S.A., DIGGLE, S.P., BUCKLING, A., GARDNER, A., GRIFFIN, A.S. The social lives of microbes. In: *The Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, 2007, no.38, p.53-77. eISSN 1545-2069
5. COSTERTON, J.W., LEWANDOWSKI, Z., CALDWELL, D.E., et al. Microbial films. In: *Annual Reviews in Microbiology*, 1995, no.49, p.711-745. eISSN 1545-3251
6. Harvey, R.J., Lund, V.J. Biofilms and chronic rhinosinusitis: systematic review of evidence, current concepts and directions for research. În: *Rhinology*, 2007, no.45, p.3-13.

7. Hall Stoodley, L., Stoodley, P. Evolving concepts in biofilm infections. În: *Cell Microbiol Infect Immun*, 2009, no.73, p.4653-4667.
8. HARDING, M.W., MARQUES, L.L.R., HOWARD, R.J., OLSON, M.E. Can filamentous fungi form biofilms? In: *Trends in Microbiology*, 2009, no.17, p.475-480. ISSN 1878-4380 (online)
9. KECK, T., LEIACKER, R., RIECHELMANN, H. et al. Temperature profile in the nasal cavity. In: *Laryngoscope*, 2000, no.110, p.651-654. Online ISSN: 1531-4995
10. BRANDA, S.S., VIK, A., FRIEDMAN, L., KOLTER, R. Biofilms: the matrix revisited. In: *Trends in Microbiology*, 2005, no.13, p.20-26. ISSN 1878-4380 (online)
11. COSTERTON, J.W., STEWART, P.S. and GREENBERG, E.P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. In: *Science*, 1999, vol.284, no5418, p.1318-1322.
12. JAMAL, M., AHMAD, W., ANDLEEB, S., JALIL, F., IMRAN, M., NAWAZ, M.A., et al. Bacterial biofilm and associated infections. In: *Journal of the Chinese Medical Association*, 2018, no.81, p.7-11.
13. WOLCOTT, R.D., EHRLICH, G.D. Biofilms and chronic infections. In: *Journal of the American Medical Association*, 2008, no.299, p.2682-2684. ISSN 0098-7484 (print), 1538-3598 (web)
14. LEWIS, K. Persister cells. In: *Annual Reviews in Microbiology*, 2010, nr.64, p.357-72. eISSN 1545-3251
15. JABRA-RIZK, M.A., FALKLER, W.A., MEILLER, T.F. Fungal biofilms and drug resistance. In: *Emerging Infectious Diseases*, 2004, no.10:14-9. ISSN 1080-6059
16. KARATAN, E., WATNICK, P. Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. In: *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2009, no.73(2):310-47. Print ISSN 1092-2172, online ISSN 1098-5557
17. RAJENDRAN, R., MAY, A., SHERRY, L., KEAN, R., WILLIAMS, C., JONES, B.L. et al. Integrating *Candida albicans* metabolism with biofilm heterogeneity by transcriptome mapping. In: *Scientific Reports*, 2016, no.6, p.354,356. ISSN: 2045-2322 (online)
18. FLEMMING, H.C., NEU, T.R., WOZNIAK, D.J. The EPS matrix: The „house of biofilm cells”. In: *Journal of Bacteriology*, 2007, no.189:7945-7947. Print ISSN 0021-9193, online ISSN 1098-5530
19. FINKEL, J.S., MITCHELL, A.P. Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. In: *Nature Reviews Microbiology*, 2011, no.9, p.109-118. ISSN 1740-1534 (online)
20. BEAUVAIS, A., MULLER, F.M. Biofilm formation in *Aspergillus fumigatus*. In: Latge J.P., Steinbach W.J., editors. *Aspergillus fumigatus and aspergillosis*. Washington (D.C.): ASM Press. 2009, p.149-157.
21. MARTINEZ, L.R., CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* biofilm formation depends on surface support and carbon source and reduces fungal cell susceptibility to heat, cold, and UV light. In: *Applied Environmental Microbiology*, 2007, no.73, p.4592-4601. online ISSN 1098-5336
22. Di BONAVENTURA, G., POMPILIO, A., PICCIANI, C., IEZZI, M., D’ANTONIO, D. et al. Biofilm formation by the emerging fungal pathogen *Trichosporon asahii*: development, architecture, and antifungal resistance. In: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2006, no.50, p.3269-3276.
23. DAVIS, L.E., COOK, G., COSTERTON, J.W. Biofilm on ventriculo-peritoneal shunt tubing as a cause of treatment failure in coccidioidal meningitis. In: *Emerging Infectious Diseases*, 2002, no.8, p.376-379. ISSN 1080-6059
24. CUSHION, M.T., COLLINS, M.S., LINKE, M.J. Biofilm formation by *Pneumocystis* spp. In: *Eukaryotic Cell*, 2009, nr.8: 197-206. Print ISSN 1535-9778, online ISSN 1535-9786
25. MILLER, M.B., BASSLER, B.L. Quorum sensing in bacteria. In: *Annual Reviews in Microbiology*, 2001, no.55, p.164-199. eISSN 1545-3251
26. Hall-Stoodley. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. In: *Nature Reviews Microbiology*, 2004, no.2(2), p.95-108. ISSN 1740-1534 (online)
27. KONG, K.F., VUONG, C., OTTO, M. *Staphylococcus* quorum sensing in biofilm formation and infection. In: *International Journal of Medical Microbiology*, 2006, no.296, p.133-139. ISSN 1438-4221
28. DONLAN, R.M., COSTERTON, J.W. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. In: *Clinical Microbiology Reviews*, 2002, no15, p.167-193. Print ISSN 0893-8512, online ISSN 1098-6618
29. ALLEGRUCCI, M., SAUER, K. Characterization of colony morphology variants isolated from *S. Pneumoniae* biofilms. In: *Journal of Bacteriology*, 2007, no189(5), p.2030-2038. Print ISSN 0021-9193, online ISSN 1098-5530
30. COSTERTON, J.W., GEESEY, G.G., CHENG, K.J. How bacteria stick. In: *Scientific American*, 1978, no238, p.86-95. ISSN 0036-8733
31. ANDES, D, NETT, J, OSCHEL, P, ALBRECHT, R, MARCHILLO, K, et al. Development and characterization of an in vivo central venous catheter *Candida albicans* biofilm model. In: *Infect Immun*, 2004, no72, p.6023-6031.
32. MM, Harriott, EA, Lilly, TE, Rodriguez, FIDEL, PL Jr, NOVERR, MC. *Candida albicans* forms biofilms on the vaginal mucosa. In: *Microbiology*, 2010, no156, p.3635-3644.
33. KAMAI, Y., KUBOTA, M., HOSOKAWA, T., FUKUOKA, T., FILLER S.G. New model of oropharyngeal candidiasis in mice. In: *Antimicrob Agents Chemother*, 2001, no45, p.3195-3197.
34. DONGARI-BAGTZOGLU, A., KASHLEVA, H., DWIVEDI, P., DIAZ, P., VASILAKOS, J. Characterization of mucosal. In: *Candida albicans biofilms*, 2009. PLoS ONE 4: e7967

35. SILVA, S., NEGRI, M., HENRIQUES, M., OLIVEIRA, R., WILLIAMS, D.W. et al. Adherence and biofilm formation of non-Candida albicans Candida species. In: *Trends Microbiol*, 2011, no.19, p.241-247.
36. MIQUEL, S, LAGRAFEUILLE, R, SOUWEINE, B, FORESTIER, C. Anti-biofilm activity as a health issue. In: *Front Microbiol.*, 2016, no7, p.592. doi: 10.3389/fmicb.2016.00592
37. BAILLIE, GS., DOUGLAS, L.J. Matrix polymers of Candida biofilms and their possible role in biofilm resistance to antifungal agents. In: *J. Antimicrob Chemother*, 2000, no46(3), p.397-403. doi:10.1093/jac/46.3.397
38. RAMAGE G., MOWAT E., JONES B., WILLIAMS C., LOPEZ-RIBOT, J. Our current understanding of fungal biofilms. In: *Crit Rev. Microbiol.*, 2009, no35(4), p.340-355. doi: 10.3109/10408410903241436
39. de BARROS, P.P., ROSSONI, R.D., de SOUZA, C.M., et al. Candida Biofilms: An Update on Developmental Mechanisms and Therapeutic Challenges. In: *Mycopathologia*, 2020, no185, p.415-424. [Accesat: 20.03.2020]. Disponibil: <https://doi.org/10.1007/s11046-020-00445-w> Print ISSN 0301-486X, electronic ISSN 1573-0832
40. PADDER, S.A., PRASAD, R. and SHAH, A.H. Quorum sensing: A less known mode of communication among fungi. In: *Microbiological Research.*, 2018, no.210, p.51-58. DOI: 10.1016/j.micres.2018.03.007. ISSN 0944-5013
41. RUTHERFORD, S.T., BASSLER, B.L. Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control. In: *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2012, no2(11), p.a012427. Published 2012 Nov 1. doi:10.1101/cshperspect.a.012427. Online ISSN 2157-1422
42. FLEMMING, H.C., WINGENDER, J., SZEWCZYK, U., STEINBERG, P., RICE, S.A., KJELLEBERG, S. Biofilms: an emergent form of bacterial life. In: *Nature Reviews Microbiology*, 2016, no14, p.563-575. ISSN 1740-1534 (online)
43. SIMOES, M., SIMOES, L.C., VIEIRA, M.J. A review of current and emergent biofilm control strategies. In: *LWT – Food Science and Technology*. (Lebensmittel-Wissenschaft-Technol.), 2010, no.43, p.573-583.
44. STOODLEY, P., DEBEER, D., LEWANDOWSKI, Z. Liquid Flow in Biofilm Systems. In: *Applied Environmental Microbiology*, 1994, vol.60, p.2711-27. Print ISSN 0099-2240, online ISSN 1098-5336
45. LAWRENCE, Jr., KORBER, D.R., HOYLE, B.D., COSTERTON, J.W., CALD-WELL, D.E. Optical sectioning of microbial biofilms. In: *Journal of Bacteriology*, 1991, vol.173, p.6558-6567. Print ISSN 0021-9193, online ISSN 1098-5530
46. MITCHELL, K.F., ZARNOWSKI, R., ANDES, D.R. The extracellular matrix of fungal biofilms. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2016, no 931, p.21-35. ISSN 0065-2598
47. JENNINGS, L.K., STOREK, K.M., LEDVINA, H.E. et al. Pel is a cationic exopolysaccharide that cross-links extracellular DNA in the Pseudomonas aeruginosa biofilm matrix. In: *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 2015, no.112, p.11353-11358. Online ISSN 1091-6490
48. REICHHARDT, C., STEVENS, D.A., CEGELSKI, L. Fungal biofilm composition and opportunities in drug discovery. In: *Future Medicinal Chemistry*, 2016, no.8, p.1455-1468. ISSN (print): 1756-8919, ISSN (online): 1756-8927
49. MATHE, L., van DIJCK, P. Recent insights into Candida albicans biofilm resistance mechanisms. In: *Current Genetics*, 2013, no.59, p.251-264. ISSN: 0172-8083
50. AI-FATTANI, M.A., DOUGLAS, L.J. Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. In: *Journal of Medical Microbiology*, 2006, no55, p.999-1008. ISSN 0022-2615, e-ISSN 1473-5644
51. MOWAT, E., WILLIAMS, C., JONES, B., McCHLERY, S., RAMAGE, G. The characteristics of Aspergillus fumigatus mycetoma development: is this a biofilm? In: *Medical Mycology*, 2009, no47: Suppl 1S, p.120-126. ISSN 1369-3786
52. LOUSSERT, C., SCHMITT, C., PREVOST, M.C., BALLOY, V., FADEL, E., et al. *In vivo* biofilm composition of Aspergillus fumigatus. In: *Cellular Microbiology*, 2010, no.12, p.405-410.
53. SINGHAL, D., BAKER, L., WORMALD, P.J., TAN, L. *Aspergillus fumigatus* biofilm on primary human sinonasal epithelial culture. In: *American Journal of Rhinology and Allergy*, 2011, no25, p.219-225. ISSN 1945-8924, online ISSN 1945-8932
54. LERMANN, U., MORSCHHAUSER, J. Secreted aspartic proteases are not required for invasion of reconstituted human epithelia by *Candida albicans*. In: *Journal of Microbiology*, 2008, no.154, p.3281-3295. Print ISSN 1225-8873, electronic ISSN 1976-3794
55. DAVIS, L.E., COOK, G., COSTERTON, J.W. Biofilm on ventriculo-peritoneal shunt tubing as a cause of treatment failure in coccidioidal meningitis. In: *Emerging Infectious Diseases*, 2002, no8, p.376-379. ISSN 1080-6059
56. LEAR, G., LEWIS, G.D. *Microbial Biofilms: Current Research and Applications*. Norfolk: Caister Academic Press, 2012.
57. DAVIES, D.G., MARQUES, C.N. A fatty acid messenger is responsible for inducing dispersion in microbial biofilms. In: *Journal of Bacteriology*, 2009, no191(5), p.1393-403. Print ISSN 0021-9193, online ISSN 1098-5530
58. GREENBERG, E.P. Bacterial communication and group behavior. In: *Journal of Clinical Investigation*, 2003, no112, p.1288-1290. ISSN 0021-9738 (print), 1558-8238 (online)
59. WOLCOTT, R.D., EHRLICH, G.D. Biofilms and chronic infections. In: *Journal of the American Medical Association*, 2008, no299, p.2682-2684. ISSN 0098-7484

60. RAMAGE, G., MOWAT, E., JONES, B., WILLIAMS, C., LOPEZ-RIBOT, J. Our current understanding of fungal biofilms. In: *Critical Reviews in Microbiology*, 2009, no35, p.340-355. ISSN 1040-841X (print); 1549-7828 (web).
61. WONGSUK, T., PUMESAT, P., LUPLERTLOP, N. Fungal quorum sensing molecules: Role in fungal morphogenesis and pathogenicity. In: *Journal of Basic Microbiology*, 2016, no56, p.440-447.
62. SARDI, J. de C., PITANGUI, N. de S., RODRIGUEZ-ARELLANES, G., TAYLOR, M.L., FUSCO-ALMEIDA, A.M., MENDES-GIANNINI, M.J. Highlights in pathogenic fungal biofilms. In: *Revista Iberoamericana de Micologia*, 2014, no31, p.22-29. ISSN 1130-1406
63. ALBUQUERQUE, P., CASADEVALL, A. Quorum sensing in fungi – A review. In: *Medical Mycology*, 2012, no50, p.337-345. ISSN 1369-3786
64. DEEP, A., CHAUDHARY, U., GUPTA, V. Quorum sensing and Bacterial Pathogenicity: From Molecules to Disease. In: *Journal of Laboratory Physicians*, 2011, no3(1), p.4-11. doi: 10.4103/0974-2727.78553. ISSN: 0974-2727.
65. LI, Y.H., TIAN, X. Quorum sensing and bacterial social interactions in biofilms. In: *Sensors* (Basel), 2012, no12(3), p.2519-2538. doi:10.3390/s120302519. ISSN 1424-8220
66. LEWIS, K. Persister cells: Molecular mechanisms related to antibiotic tolerance. In: *Handbook of Experimental Pharmacology*, 2012, p.121-133. ISSN 0171-2004
67. MUKHERJEE, P.K., CHANDRA, J., KUHN, D.M., GHANNOUM, M.A. Mechanism of fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms: Phase-specific role of efflux pumps and membrane sterols. In: *Infection and Immunity*, 2003, no71, p.4333-4340
68. SOTO, S.M. Role of efflux pumps in the antibiotic resistance of bacteria embedded in a biofilm. In: *Virulence*, 2013, no.4, p.223-229. Print ISSN 2150-5594, Online ISSN 2150-5608
69. GEBREYOHANNES, G., NYERERE, A., BII, C., SBHATU, D.B. Challenges of intervention, treatment, and antibiotic resistance of biofilm-forming microorganisms. In: *Heliyon*, 2019, no5(8), p.e 02192. Published 2019 Aug 19. doi:10.1016/j.heliyon.2019.e02192. ISSN: 2405-8440.
70. SHARMA, D., MISBA, L. and KHAN, A.U. Antibiotics versus biofilm: an emerging battleground in microbial communities. In: *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 2019, no8, p.76. [Accesat: 15.01.2020] Disponibil <https://doi.org/10.1186/s13756-019-0533> . ISSN 2047-2994
71. THIEN-FAH, C. Mah, George A. O'TOOLE. Review. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. In: *Trends in Microbiology*, 2001, vol.9, Issue 1, p.34-39. [Accesat: 18.04. 2020] Disponibil: [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(00\)01913-2](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(00)01913-2). ISSN 1878-4380 (online)
72. SANDAI, D., TABANA, Y.M., OUWEINI, A.E., AYODEJI, I.O. Resistance of *Candida albicans* Biofilms to Drugs and the Host Immune System. In: *Jundishapur Journal of Microbiology*, 2016, no.9(11), p. e37385. doi: 10.5812/ijm.37385. ISSN print: 2008-3645, electronic: 2008-4161.
73. SINGH, S., SINGH, S.K., CHOWDHURY, I., SINGH, R. Understanding the Mechanism of Bacterial Biofilms Resistance to Antimicrobial Agents. In: *Open Microbiology Journal*, 2017, no11, p.53-62. doi:10.2174/1874285801711010053. ISSN 1874-2858
74. TAFF, H.T., MITCHELL, K.F., EDWARD, J.A., ANDES, D.R. Mechanisms of *Candida* biofilm drug resistance. In: *Future Microbiology*, 2013, no8, p.1325-1337.
75. SHUNMUGAPERUMAL, T. *Biofilm Eradication and Prevention: A Pharmaceutical Approach to Medical Device Infections*. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.; 2010, p.116-151.
76. McCALL, A.D., PATHIRANA, R.U., PRABHAKAR, A. et al. *Candida albicans* biofilm development is governed by cooperative attachment and adhesion maintenance proteins. In: *npj Biofilms and Microbiomes*, 2019, no5, p.21. [Accesat: 12.05.2020] Disponibil: <https://doi.org/10.1038/s41522-019-0094-5>. ISSN 2055-5008 (online)
77. MOWAT, E., LANG, S., WILLIAMS, C., McCULLOCH, E., JONES, B., RAMAGE, G. Phase-dependent antifungal activity against *Aspergillus fumigatus* developing multicellular filamentous biofilms. In: *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2008, no62, p.1281-1284.
78. NIIMI, M., FIRTH, N.A., CANNON, R.D. Antifungal drug resistance of oral fungi. In: *Odontology*, 2010, no98, p.15-25.
79. RAMAGE, G., RAJENDRAN, R., SHERRY, L., WILLIAMS, C. Fungal biofilm resistance. In: *International Journal of Microbiology*, 2012, p.521-528. ISSN 1687-918X (Print), ISSN 1687-9198 (Online)
80. CAVALHEIRO, M., TEIXEIRA, M.C. *Candida* Biofilms: Threats, Challenges, and Promising Strategies. In: *Frontiers in Medicine* (Lausanne), 2018, no5, p.28. Pdoi:10.3389/fmed.2018.00028. ISSN: 2095-0217 (print), 2095-0225 (web)
81. CHANDRA, J., MUKHERJEE, P.K., LEIDICH, S.D. et al. Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic in vitro. In: *Journal of Dental Research*, 2001, no80(3), p.903-908.
82. LaFLEUR, M.D., KUMAMOTO, C.A., LEWIS, K. *Candida albicans* biofilms produce antifungal-tolerant persister cells. In: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2006, no50, p.3839-3846.
83. RODRIGUES, M.E. et al. *Candida* spp./Bacteria Mixed Biofilms. In: *Journal of Fungi*, 2020, no6, p.5; doi:10.3390/jof6010005. ISSN 2309-608X

84. LEWIS, K.I.M. Riddle of biofilm resistance. In: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2001, no45, p.999-1007. doi:10.1128/AAC.45.4.999-1007.2001. Print ISSN 0066-4804, online ISSN 1098-6596
85. LEBEAUX, D., GHIGO, J.M., BELOIN, C. Biofilm-related infections: bridging the gap between clinical management and fundamental aspects of recalcitrance toward antibiotics. In: *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2014, no78(3), p.510-543.
86. MARTINS, M., UPPULURI, P., THOMAS, D.P., CLEARY, I.A., HENRIQUES, M., LOPEZ-RIBOT, J.L., et al. Presence of extracellular DNA in the *Candida albicans* biofilm matrix and its contribution to biofilms. In: *Mycopathologia*, 2010, no169, p.323-31.
87. COENYE, T., BRACKMAN, G., RIGOLE, P., et al. Eradication of *Propionibacterium acnes* biofilms by plant extracts and putative identification of icariin, resveratrol and salidroside as active compounds. In: *Phytomedicine*, 2012, no19, p.409-412.
88. CRAGG, G.M., NEWMAN, D.J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. In: *Biochimica et Biophysica Acta*, 2013, no1830(6), p.3670-3695.
89. BORCHARDT, J.K. The Beginnings of Drug Therapy: Ancient Mesopotamian Medicine. In: *Drug News and Perspectives*, 2002, no15(3), p.187-192. ISSN 0214-0934
90. DEV, S. Ancient-modern concordance in Ayurvedic plants: some examples. In: *Environmental Health Perspectives*, 1999, no107(10), p.783-9. ISSN 0091-6765 (print); 1552-9924 (web)
91. BINK, A., PELLENS, K., CAMMUE, B.P., THEVISSSEN, K. Anti-biofilm strategies: How to eradicate *Candida* biofilms? In: *Open Microbiology Journal*, 2011, no5, p.29-38. ISSN 1874-2858
92. LU, L., Hu, W., TIAN, Z., et al. Developing natural products as potential anti-biofilm agents. In: *Chinese Medical Journal*, 2019, no14, p.11.
93. SHAHID, M., SHAHZAD, A., SOBIA, F., et al. Plant natural products as a potential source for antibacterial agents: recent trends. În: *Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry*, 2009, no8, p.211-225. ISSN (Print) 1871-5214, ISSN (Online) 1875-6018

Date despre autor:

Olga BURDUNIUC, doctor în științe medicale, conferențiar universitar, USMF „Nicolae Testemițanu”; șef laborator *Microbiologie, Agenția Națională pentru Sănătate Publică*.

E-mail: olgaburduniuc3@gmail.com

ORCID: 0000-0002-6944-0800

Prezentat la 29.06.2020