

*Irina Netsvetyayeva, Ewa Swoboda-Kopeć

Candida parapsilosis – zmienne oblicze

Changing face of *Candida parapsilosis*

Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Warszawski Uniwersytet Medyczny
Kierownik Katedry i Zakładu: prof. dr hab. Grażyna Młynarczyk

Streszczenie

Candida parapsilosis jest ważnym czynnikiem drożdżakowego odcewnikowego zakażenia krwi. Głównym czynnikiem zjadliwości *C. parapsilosis* jest zdolność kolonizowania sztucznych powierzchni. Zdolność kolonizacji jest uwarunkowana zdolnością wzrostu w postaci biofilmu. Czynnikiem warunkującym rozwój biofilmu jest *yeast/hyphal transition* – przemiana komórek z formy planktonicznej w formę pseudostrzępkową oraz *phenotypic switching* – transformacja fenotypowa kolonii w obrębie jednego szczepu.

Cel pracy. Ocena częstości występowania zmienności fenotypowej klinicznych szczepów *Candida parapsilosis*; charakterystyka morfotypów *C. parapsilosis*, porównanie ich cech fenotypowych: zdolności asymilacji cukrów oraz zdolności wytwarzania biofilmu.

Materiał i metody. Kliniczne szczepy *Candida parapsilosis* pochodzące z kolekcji Pracowni Mikologicznej Katedry i Zakładu Mikrobiologii Lekarskiej. Grupę badaną stanowiło 40 szczepów *Candida parapsilosis* wykazujących zmienność fenotypową kolonii w pierwotnych posiewach. Do grupy porównawczej włączono 20 szczepów klinicznych nie wykazujących zmienności fenotypowej kolonii.

Badanie zdolności asymilacji cukrów przeprowadzono za pomocą testu ID 32C, przy użyciu automatycznego systemu ATB Expression (bioMérieux, Poland), badanie zdolności wzrostu w postaci biofilmu przeprowadzono metodą spektrofotometryczną. Analiza statystyczna wyników została przeprowadzona przy użyciu testów U Manna Whitney'a, korelacji Spearmana oraz korelacji ANOVA testu Kruskala-Wallisa.

Wyniki. Zjawisko zmienności fenotypowej kolonii stwierdzono u około 16% szczepów. Opisano cztery stabilne, podlegające dziedziczeniu morfotypy: gładki, pomarszczony, krateropodobny, koncentryczny. Wśród wyodrębnionych morfotypów stwierdzono statystycznie istotne różnice w zdolności asymilacji D-trehalozy, D-rybozy, kwasu lewulinowego. Większą zdolność tworzenia biofilmu prezentują morfotypy pseudostrzępkowe.

Wnioski. Morfotypy *Candida parapsilosis* charakteryzują się odmiennością cech biochemicznych oraz zróżnicowaną zdolnością wytwarzania środowiska biofilmu.

Słowa kluczowe: *Candida parapsilosis*, morfotypy, biofilm, zmienność fenotypowa

Summary

Candida parapsilosis is an opportunistic fungal pathogen, which causes the nosocomial infections. Now, it is established well that *Candida* spp. via contaminated vascular catheters, interacts with host defences as well as passes along the intravascular compartment to invade deep tissues. This is probably due to the ability to grow as a biofilm. *C. parapsilosis* biofilm formation is closely correlated with a virulence. This biofilm development is particularly associated with the phenotype switching. Materials for the analysis consisted of catalogued *Candida parapsilosis* strains forming different morphological colony forms, cultured from clinical materials on Sabouraud Agar plates. Clinical samples (blood, vessel catheters, urine, and skin swabs) were collected through routine mycological diagnostic procedures from patients hospitalized in the Infant Jesus Clinical Hospital in 2005 and 2006. Research was performed on 40 clinical strains and control group consisted of 20 strains growing only as the smooth morphological colony form in primary cultures. Biofilm production was assessed using the spectrophotometric method. Statistical analysis was made using the Mann-Whitney U nonparametric test with Spearman and Kruskal-Wallis ANOVA correlations. The *phenotypic switching* was observed in 16% of *C. parapsilosis* strains. Four stable phenotypes were identified: crepe, concentric, smooth and crater. Significant statistical differences were found in the assimilation of D-trehalose, D-ribose, and levulinic acid. Biofilm forming capabilities were demonstrated in all strains from the control group and all isolates of *crepe*, *crater*, and *concentric* phenotypes. The lack of these capabilities were demonstrated in five isolates of the smooth phenotype from the research group.

Key words: *Candida parapsilosis*, phenotypes, biofilm formation, phenotype switching

WSTĘP

Candida parapsilosis jest gatunkiem grzybów drożdżopodobnych po raz pierwszy opisanym w 1928 roku przez Ashford, który wyizolował tego drożdżaka z materiału od pacjentów z biegunką tropikalną w Puerto Rico (1). Nie uważał go jednak za czynnik etiologiczny tego schorzenia – stąd w nazwie gatunkowej użył: „para” (około) i „psilosis” (sprue tropikalna – schorzenie przewodu pokarmowego prowadzące do zaburzeń wchłaniania substancji odżywczych, zwłaszcza witaminy B₁₂ i kwasu foliowego).

Obecnie ten gatunek uznawany jest za ważny czynnik etiologiczny zakażeń szpitalnych, na które są narażeni pacjenci poddani procedurom medycznym, związanym z obecnością cewników naczyniowych oraz wszelkiego rodzaju drenów (2).

Liczba odcewnikowych zakażeń łóżyska naczyniowego spowodowanych *C. parapsilosis* dramatycznie wzrosła w ciągu ostatnich dwudziestu lat. W retrospektywnym badaniu przeglądowym Wingarda (3) obejmującym lata 1952-1992 gatunek ten określono jako rzadki patogen wykrywany u człowieka. Ogólną liczbę zakażeń spowodowanych tym drożdżakiem oszacowano tylko na 6% wśród wszystkich kandydoz. W badaniach przeprowadzonych w USA i Europie pod koniec lat 90. stwierdzono, że *C. parapsilosis* jest najczęstszą przyczyną odcewnikowych fungemii w niektórych klinikach (4). **W wyniku badań retrospektywnych obejmujących pacjentów poddanych leczeniu immunosupresyjnemu hospitalizowanych w Instytucie Transplantologii oraz Klinice Chirurgii Ogólnej i Transplantacyjnej AM w Warszawie, gatunek *Candida parapsilosis* uznano za najczęstszy (56%) czynnik etiologiczny fungemii odcewnikowych w latach 2005-2007** (5).

Grzybice uogólnione o etiologii *C. parapsilosis* mają bezpośredni związek z obecnością cewników naczyniowych, którą uznano za wiodący czynnik ryzyka rozwoju tego typu zakażeń (6). Jest to związane przede wszystkim ze zwiększoną zdolnością tego gatunku do produkcji pozakomórkowego śluzu oraz bardziej skutecznymi właściwościami adherencyjnymi do sztucznych powierzchni, niż prezentują to inne gatunki (6, 7, 8). Innymi czynnikami ryzyka są: zabiegi przeszczepienia narządów unaczynionych, żywienie pozajelitowe, wcześniactwo (4, 9, 10), ciągła dializa otrzewnowa (11), zabieg wszczepienia sztucznych zastawek serca (2). Ciekawymi, a zarazem niepokojącymi wydają się wyniki badań Forrest’a GN i wsp. opublikowane w 2008 roku. Retrospektywnej analizie poddano 469 przypadków fungemii w klinice *University of Maryland* (Baltimore, USA) zanotowane w latach 2002-2006. W epidemiologii *Candida species* zaobserwowano zmianę odkaś do leczenia została wprowadzona kaspofungina (lek przeciwwgrzybiczy z grupy echinokandyn). Stwierdzono statystycznie znamiennej związek pomiędzy zwiększeniem zużycia kaspofunginy, a zwiększeniem częstotliwości występowania fungemii *Candida parapsilosis*, zmniejszeniem liczby przypadków *Candida tropicalis*

oraz tendencję do obniżenia udziału *Candida glabrata* jako czynnika etiologicznego tego typu zakażeń u pacjentów kliniki. Wiąże się to z naturalnie obniżoną wrażliwością gatunku *Candida parapsilosis* na echinokandyny (12).

CECHY BIOCHEMICZNE

Fermentuje glukozę, galaktozę, wyjątkowo sacharozę i maltozę. Asymiluje: glukozę, glicerol, 2-keto-D-glukonian, L-arabinozę, D-ksilozę, adonitol, galaktozę, sorbitol, L-metylo-D-glukozyd, N-acetylo-glukozaminę, maltozę, sacharozę, trehalozę i melezytozę, pojedyncze szczepy – także ksylitol; nie rozkłada arbutyny; wytwarza ureazę (8).

CZYNNIKI ZJADLIWOŚCI

Wiedza na temat czynników zjadliwości *Candida parapsilosis* jest bardzo ograniczona w porównaniu z uważanym za dominujący i o wiele lepiej poznanym gatunkiem *Candida albicans*. Najistotniejszymi cechami decydującymi o zjadliwości drożdżaków są: zdolność adherencji do tkanek gospodarza oraz sztucznych powierzchni (13), zdolność wzrostu w postaci biofilmu, produkcja enzymów proteolitycznych, *yeast/hyphal transition* (przemiana formy drożdżakowej w formę pseudostrzępkową) oraz *phenotypic switching* (transformacja fenotypowa kolonii w obrębie jednego szczepu) (14), produkcję enzymów: fosfolipazy (np. *phospholipase B*) oraz proteinazy (np. *secreted aspartyl proteases* [SAPs]). Przemiana z formy drożdżakowej w formę pseudostrzępkową (*yeast/hyphal transition*) nie jest cechą charakterystyczną dla każdego gatunku należącego do rodzaju *Candida* spp. Zjawisko to jest decydującym we wczesnych stadiach zakażenia grzybiczego, gdy kolonizacja drożdżakowa przeistacza się w zakażenie. Formy pseudostrzępkowe posiadają zdolności inwazyjne – możliwość wrastania w przestrzeń międzykomórkową, pokonywanie bariery ochronnej skóry i śluzówek oraz rozprzestrzenianie się w głąb tkanek (15).

Phenotypic switching – zdolność szybkiej zmienności fenotypowej kolonii w obrębie jednego szczepu wiąże się również z ekspresją innych cech fenotypowych, które mają istotne znaczenie w patogenie zakażenia grzybiczego. Jest to przejawem przemiany z formy drożdżakowej w formy pseudostrzępkowe, co powoduje zmianę morfologii kolonii oraz jest związane ze zmianami w ekspresji glikoprotein ściany komórkowej, enzymów proteolitycznych, wrażliwością na działanie lizosomalnych enzymów neutrofilii oraz substancje przeciwdrobnoustrojowe. Pozwala to na szybką adaptację do zmiennych warunków środowiska, unikanie mechanizmów odpowiedzi immunologicznej gospodarza oraz działania leków przeciwwgrzybiczych (16).

Grzyby drożdżopodobne posiadają zdolność wzrostu w postaci biofilmu.

Biofilm (z ang. film – warstwa) – błona biologiczna – zorganizowana populacja drobnoustrojów osadzona w wytworzonej przez nie macierzy, zbudowanej z poli-

merów występujących na powierzchniach żywych tkanek makroorganizmu lub na powierzchniach sztucznych (17). Jest to warstwowy złożony strukturalnie i funkcjonalnie system mikrokolonii o dużej dynamice, w którym poszczególne elementy spełniają różne funkcje, a komórki pozostają we wzajemnych relacjach i zależnościach, przekazując sobie informacje (18).

W środowisku biofilmu występują komórki grzybów zarówno w formie blastospor, jak i form pseudomicelialnych. Każda mikrokolonia wchodząca w skład biofilmu jest zbudowana z dwóch warstw – podstawowej, zawierającej głównie blastosporę i warstwy zewnętrznej, zawierającej strzępki lub pseudostrzępki. Całą konstrukcję scala macierz zewnątrzkomórkowa, w której obserwuje się złożony system kanałów, przez które do komórek doprowadzane są substancje odżywcze oraz odprowadzane produkty przemiany metabolicznej. Drożdżaki wznoszące w postaci biofilmu reprezentują wysoką różnorodność fenotypową i odmienność morfologiczną – znacznie większą, niż osobniki swobodnie rozproszone tzw. komórki planktoniczne (19). Biofilm obserwowany *in vitro* i *in vivo* ma strukturę niejednorodną i składa się z kilku warstw komórek o różnej budowie. Pierwsza warstwa, która ma bezpośredni kontakt z kolonizowaną powierzchnią zawiera komórki w formie planktonicznej, druga – komórki w formie pseudostrzępkowej (19). Sugeruje to, że morfologiczna niejednorodność *Candida parapsilosis*, czyli zdolność wytwarzania form pseudostrzępkowych odgrywa istotną, a nawet decydującą rolę w rozwoju biofilmu (20).

CEL PRACY

1. Ocena częstości występowania fenotypowej zmienności kolonii klinicznych szczepów *Candida parapsilosis*.
2. Charakterystyka morfologii form fenotypowych kolonii *Candida parapsilosis* powstałych z próbek materiałów klinicznych.
3. Wykazanie różnic fenotypowych: cech biochemicznych oraz zdolności wytwarzania biofilmu morfotypów uzyskanych z szczepów klinicznych *Candida parapsilosis*.

MATERIAŁ I METODY

Materiał do badań stanowiły 2032 szczepów grzybów drożdżopodobnych, wśród których zidentyfikowano 254 szczepy *Candida parapsilosis*. Szczepy były wyizolowane z próbek klinicznych: krew, płyn mózgowo-rdzeniowy, mocz, inne płyny ustrojowe, cewniki naczyniowe, materiały śródoperacyjne, wycinki tkankowe, wydzielina z dolnych dróg oddechowych, drewny różnego rodzaju, kał, wymazy z jamy ustnej, ucha zewnętrznego, gardła, miejsca operowanego, rany, odbytu, cewki moczowej, wymazy ze zmian skórnych. Szczepy *Candida parapsilosis* wyhodowano z materiałów od pacjentów hospitalizowanych w Szpitalu Klinicznym Dzieciątka Jezus Akademii Medycznej w Warszawie w latach 2005-2006. Grupę porównawczą stanowiło 20 szczepów tego samego gatunku wytwa-

rzające wyłącznie jedną morfologiczną formę kolonii – gładką w pierwotnych hodowlach z materiałów klinicznych.

Badanie materiału klinicznego oraz identyfikacja mikologiczna grzybów drożdżopodobnych i pleśniowych została przeprowadzona zgodnie ze standardowymi procedurami laboratoryjnymi według rekomendacji CLSI. Materiał posiewano na agar Sabourauda z antybiotykami: chloramfenikolem i gentamycyną (bioMerieux). Inkubację prowadzono w warunkach tlenowych w temperaturze 30°C przez 10 dni. Identyfikację biochemiczną grzybów drożdżopodobnych wykonano przy użyciu testu API ID 32 C (bioMerieux).

Po zidentyfikowaniu szczepu *Candida parapsilosis* wytwarzającego różne formy fenotypowe, wykonywano izolacje kolonii o odmiennych fenotypach na podłożach: Sabouraud Agar, płynne podłoże Sabouraud, Sabouraud Agar z chloramfenikolem oraz Sabouraud Agar z gentamycyną i chloramfenikolem. Podłoża o różnym składzie zostały użyte celem ustalenia stabilności oraz powtarzalności wyhodowanych form fenotypowych kolonii. Czas hodowli przedłużono do 10 dni w celu najlepszego wyeksponowania cech kolonii charakterystycznych dla poszczególnych odmian morfologicznych.

Wytwarzanie biofilmu szacowano przy użyciu metody spektrofotometrycznej opisaną przez Jong Hee Shin i wsp. (21). Czyste hodowle form fenotypowych inkubowano 24 godziny w temperaturze 35°C na podłożu Sabouraud Dextrose Agar. Następnie sporządzono zawiesinę w 0,9% NaCl o zmętnieniu 1,0 w skali McFarlanda, co odpowiada 3×10^7 CFU/ml. Do każdej mikroprowówki płytki titracyjnej (MedLab, Polska) dodawano 20 μ l zawiesiny drożdżaków oraz 180 μ l SDB (Sabouraud dextrose broth) – płynne podłoże Sabouraud (bioMerieux) przygotowane zgodnie z instrukcją producenta oraz suplementowane 60 g glukozy na 1 litr. Stężenie glukozy w otrzymanym podłożu – 80 g/l. Próbę dla każdego izolatu wykonywano w dwóch równoległych próbkach. Próbkę kontrolną zawierały płynne podłoże SDB bez dodawania zawiesiny drożdżaków. Mikropłytki inkubowano 24 godziny w temperaturze 35°C. Po inkubacji studzienki mikropłytek trzykrotnie wypłukano destylowaną wodą przy użyciu pipety wielokanałowej. Odczyt spektrofotometryczny dokonano w czytniku mikropłytek PR3100 (BIORAD) przy długości fali 405 nm, po dodaniu do każdej mikroprowówki 200 μ l wody destylowanej. Za parametry graniczne dla oceny wytworzonego biofilmu uznano wartość $\%T_{\text{bloc}}$, procent ilości światła, absorbowanego przy przechodzeniu przez każdą próbkę badaną w porównaniu z absorbancją próbek kontrolnych ($\%T_{\text{blank}}$) zawierających tylko destylowaną wodę.

$\%T_{\text{bloc}} = \%T_{\text{blank}} - \%T$. Zdolność tworzenia biofilmu określono według skali:

Ujemna – $\%T_{\text{bloc}} < 5$, minimalna (1+) – $\%T_{\text{bloc}} = 5 - 20$, słabo dodatnia (2+) – $\%T_{\text{bloc}} = 21 - 35$, dodatnia (3+) – $\%T_{\text{bloc}} = 36 - 50$, maksymalna (4+) – $\%T_{\text{bloc}} > 51$.

Analiza statystyczna wyników została dokonana przy użyciu testów nieparametrycznych U Manna Whitney'a, korelacji Spearmana oraz korelacji ANOVA testu Kruskala – Wallisa.

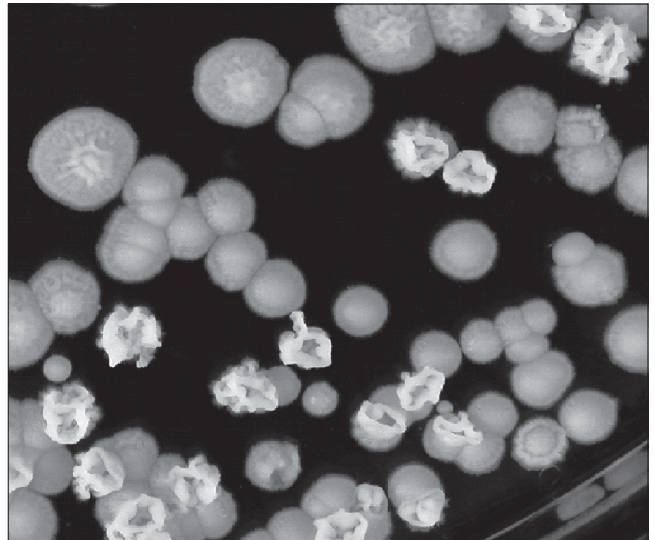
WYNIKI

Wśród 2032 hodowli grzybów drożdżopodobnych uzyskanych z materiałów klinicznych, 254 szczepy zidentyfikowano jako *Candida parapsilosis* z prawdopodobieństwem powyżej 90% i oceną identyfikacji jako „bardzo dobra” lub „doskonała”. Gatunek *Candida parapsilosis* stanowił 12,5% wszystkich szczepów grzybów drożdżopodobnych. W 214 (84,3%) przypadkach hodowla pierwotna zawierała kolonie o jednolitej budowie, hodowle pierwotne 40 (15,7%) szczepów prezentowało kolonie o różnicowanej strukturze. Szczepy wzrastające w postaci kolonii o odmiennej budowie stanowiły około 16% w ogólnej liczbie szczepów należących do gatunku *Candida parapsilosis*. Wzrost fenotypowo różnicowanych kolonii uzyskano w hodowlach posiewów: 4 cewników naczyniowych, 13 posiewów krwi, 15 posiewów moczu, 6 wymazów ze zmian skórnych, 2 wymazów z ucha zewnętrznego.

Na rycinie 1 przedstawione są morfologicznie odmienne formy kolonii *Candida parapsilosis*.

Przy analizie i opracowaniu morfologii kolonii wytwarzanych przez szczepy kliniczne opisano i wyizolowano w postaci czystych hodowli cztery stabilne, podlegające dziedziczeniu morfotypy gatunku *Candida parapsilosis*: gładki, pomarszczony, krateropodobny, koncentryczny.

Do morfotypu gładkiego zaliczono okrągłe, gładkie, lśniące, regularne kolonie, wyglądające w obrazie mikroskopowym jako okrągłe lub owalne blastospori pączkujące, nie wytwarzające pseudostrzępek,

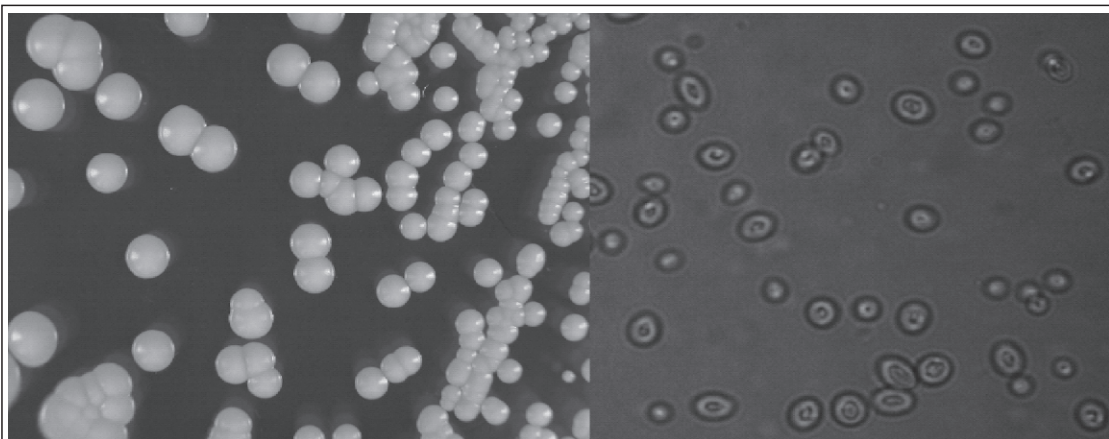


Hodowla *Candida parapsilosis* posiewu krwi od pacjenta hospitalizowanego na Oddziale Intensywnej Terapii z urazem wielonarządowym, niewydolnością wielonarządową, zawierająca kolonie o odmiennej budowie.

Ryc. 1. Hodowla na SDA *Candida parapsilosis* prezentująca kolonie o różnorodnej budowie.

charakteryzujące się równomierną zawieszalnością w soli fizjologicznej. Rycina 2 przedstawia hodowle na Sabouraud Agar z gentamycyną oraz obraz mikroskopowy morfotypu gładkiego.

Do morfotypu pomarszczonego zaliczono kolonie nieregularne, z falistym brzegiem wznoszące się nad podłożem, mocno pomarszczone, z mierną zawieszalnością w soli fizjologicznej. W preparacie mikroskopowym – liczne pseudostrzępki. Rycina 3 przedstawia hodowle na Sabouraud Agar z gentamycyną oraz obraz mikroskopowy morfotypu po-



Zdjęcie po lewej przedstawia hodowle na Sabouraud Agar z gentamycyną. Zdjęcie po prawej – preparat mikroskopowy w powiększeniu x 1000 pod immersją

Ryc. 2. Morfotyp gładki.

marszczonego.

Do morfotypu koncentrycznego zaliczono kolonie okrągłe regularne w koncentryczne wzory. W preparacie mikroskopowym widoczne są wydłużone komórki zlepione w grudki różnej wielkości. Z tej formy niemożliwe jest uzyskanie jednorodnej zawiesiny w soli fizjologicznej. Rycina 4 przedstawia hodowle na Sabouraud Agar z gentamycyną oraz obraz mikroskopowy morfotypu koncentrycznego.

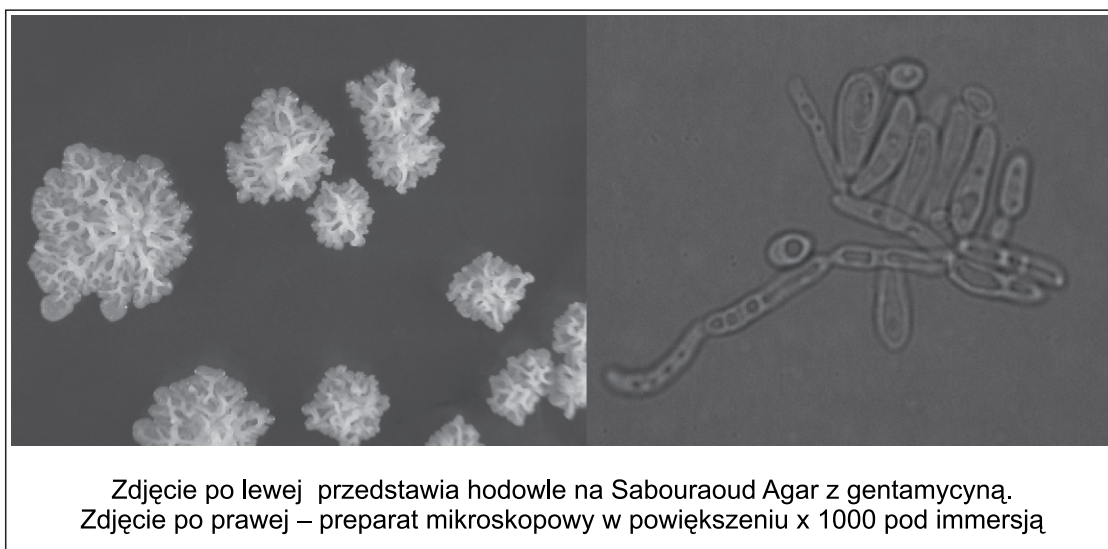
Kolonie zaliczane do fenotypu krateropodobnego wyglądem przypominają stokrotki, mają gładką lśniącą część środkową oraz mocno pofalowaną obwódkę. Mikroskopowo jest to forma pośrednia pomiędzy fenotypem gładkim a koncentrycznym – pojedyncze pączkujące komórki oraz konglomeraty wydłużonych blastospor. Rycina 5 przedstawia hodowle na Sabouraud Agar z gentamycyną oraz obraz mikroskopowy morfotypu krateropodobnego.

Z 40 szczepów klinicznych *Candida parapsilosis* wykazujących różnorodność morfologii kolonii w ho-

dowlach pierwotnych uzyskano 104 izolaty należące do czterech wyżej opisanych morfotypów: 33 izolaty o morfotypie gładkim, 39 izolatów o morfotypie pomarszczonym, 16 izolatów o morfotypie krateropodobnym i 16 izolatów o morfotypie koncentrycznym.

Wszystkie cztery odmiany: gładką, pomarszczoną, krateropodobną i koncentryczną wytwarzały 3 szczepy (7,5%). Z 10 szczepów (25%) udało się wyizolować czyste hodowle o fenotypach – gładki, pomarszczony, krateropodobny. 7 szczepów (17,5%) wykazywało zdolność do wzrostu w postaci kolonii o fenotypach – gładki, pomarszczony, koncentryczny; 1 (2,5%) – o fenotypach gładki i koncentryczny, 1 szczep (2,5%) wytworzył kolonie o fenotypie pomarszczonym, krateropodobnym, koncentrycznym. 12 szczepów (30%) wytwarzało fenotypy – gładki i pomarszczony, 4 (1%) – pomarszczony i koncentryczny, 2 szczepy (5%) – pomarszczony i krateropodobny.

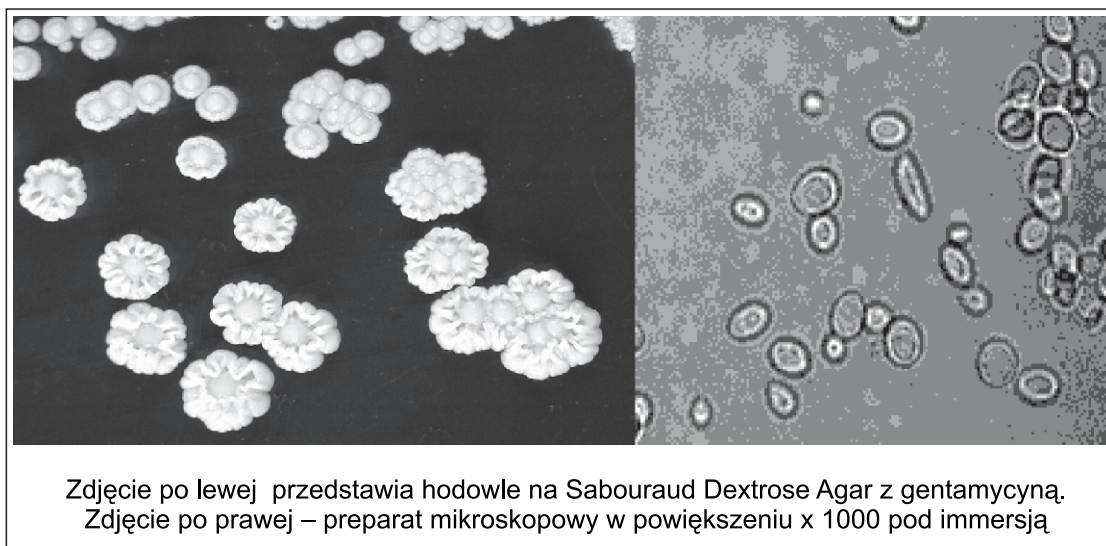
104 izolaty morfotypów *Candida parapsilosis* uzyskane z 40 szczepów grupy badanej oraz 20 szcze-



Ryc. 3. Morfotyp pomarszczony.



Ryc. 4. Morfotyp koncentryczny.



Ryc. 5. Morfotyp krateropodobny.

pów grupy porównawczej poddano identyfikacji biochemicznej przy użyciu testu ID32C, celem ustalenia zdolności do asymilacji poszczególnych substratów zawartych w teście oraz porównania ich wzorów asymilacyjnych. Wszystkie izolaty były zidentyfikowane jako gatunek *Candida parapsilosis* z prawdopodobieństwem powyżej 70%, wyniki określono jako identyfikacja „doskonała”, „bardzo dobra”, „dobra” lub „do zaakceptowania”.

Wszystkie 104 przebadane izolaty należące do grupy badanej i 20 szczepów stanowiące grupę porównawczą w 100% wykazywały zdolność do asymilacji D-galktozy, D-sacharozy, L-arabinozy, D-maltozy, 2-ketglukonianu potasu, metylo- α D-glukopiranozydu, D-sorbitolu, D-ksylozy, palatynozy, D-melezytozy, D-mannitolu, D-glukozy, L-sorbozy.

Wszystkie 104 przebadane izolaty z grupy badanej i 20 szczepów z grupy porównawczej w 100% wykazywały brak zdolności do asymilacji cykloheksamidu, kwasu mlekowego, D-celobiozy, D-rafinozy, L-ramnozy, erytrytolu, D-melibiozy, glukoronianu sodu, D-laktozy, inozytolu.

Zaobserwowano zróżnicowaną zdolność do asymilacji D-trehalozy, D-rybozy, kwasu lewulinowego, glicerolu, glukozaminy. Istotne statystycznie różnice stwierdzono w wynikach testów asymilacyjnych dla D-trehalozy, D-rybozy oraz kwasu lewulinowego.

Wyniki w grupie izolatów o fenotypie gładkim, która została otrzymana z hodowli szczepów *Candida*

parapsilosis wytwarzających różne formy fenotypowe kolonii, istotnie różniły się od wyników pozostałych grup zdolnością do asymilacji D-rybozy (Chisq = 9,45; $P < 0,05$).

Wyniki otrzymane w grupie zawierającej izolaty gładkiej formy fenotypowej istotnie odstawały od pozostałych grup zdolnością do asymilacji trehalozy (Chisq = 42,59; $P < 0,0001$).

Tabela 1 przedstawia wyniki testu zdolności asymilacji D-trehalozy wśród szczepów grupy porównawczej oraz izolatów wszystkich morfotypów *Candida parapsilosis* należących do grupy badanej.

Tabela 2 zaś przedstawia wyniki testu zdolności asymilacji D-rybozy uzyskane dla szczepów grupy porównawczej oraz izolatów wszystkich morfotypów *Candida parapsilosis* należących do grupy badanej.

Tabela 3 natomiast przedstawia wyniki testu zdolności asymilacji kwasu lewulinowego uzyskane dla szczepów grupy porównawczej oraz izolatów wszystkich morfotypów grupy badanej.

Zdolność wytwarzania biofilmu oznaczono metodą spektrofotometryczną dla 164 izolatów: 144 izolatów stanowiących grupę badaną oraz 20 szczepów z grupy porównawczej. Grupę badaną stanowiły 144 izolaty: 40 hodowle pierwotne zawierające wszystkie morfotypy produkowane przez poszczególne szczepy, 33 izolaty morfotypu gładkiego, 39 izolatów morfotypu pomarszczonego, 16 izolatów morfotypu krateropodobnego oraz 16 izolatów należących do morfoty-

Tabela 1. Wyniki testu zdolności asymilacji D-trehalozy uzyskane wśród szczepów grupy porównawczej oraz izolatów morfotypów grupy badanej.

	Izolaty	Ogółem	Wynik dodatni	Wynik ujemny	Wynik nieokreślony
	Grupa porównawcza	20 (100%)	20 (100%)	0	0
Grupa badana	morfotyp gładki	33 (100%)	33 (100%)	0	0
	morfotyp pomarszczony	39 (100%)	4 (10,25%)	31 (79,5%)	4 (10,25%)
	morfotyp krateropodobny	16 (100%)	6 (37,5%)	6 (37,5%)	4 (25%)
	morfotyp koncentryczny	16 (100%)	9 (56,25%)	4 (25%)	3 (18,75%)

Tabela 2. Wyniki testu zdolności asymilacji D-rybozy uzyskane dla szczepów grupy porównawczej oraz izolatów fenotypów grupy badanej.

Izolaty		Ogółem	Wynik dodatni	Wynik ujemny	Wynik nieokreślony
Grupa porównawcza		20 (100%)	1 (5%)	17 (85%)	2 (10%)
Grupa badana	morfotyp gładki	33 (100%)	2 (6%)	27 (81,8%)	4 (12,2%)
	morfotyp pomarszczony	39 (100%)	0	39 (100%)	0
	morfotyp krateropodobny	16 (100%)	0	12 (75%)	4 (25%)
	morfotyp koncentryczny	16 (100%)	1 (6,25%)	13 (81,25%)	(12,5%)

Tabela 3. Wyniki testu zdolności asymilacji kwasu liwulinowego uzyskane dla szczepów grupy porównawczej oraz izolatów wszystkich morfotypów grupy badanej.

Izolaty		Ogółem	Wynik dodatni	Wynik ujemny	Wynik nieokreślony
Grupa porównawcza		20 (100%)	1 (5%)	19 (95%)	0
Grupa badana	morfotyp gładki	33 (100%)	4 (12,12%)	28 (84,84%)	1 (~3%)
	morfotyp pomarszczony	39 (100%)	0	39 (100%)	0
	morfotyp krateropodobny	16 (100%)	0	15 (93,75%)	1 (6,25%)
	morfotyp koncentryczny	16 (100%)	0	12 (75%)	(25%)

pu koncentrycznego. Tabela 4 przedstawia zdolność wytwarzania biofilmu wyrażoną w punktach dla grupy porównawczej, dla wszystkich morfotypów należących do grupy badanej oraz hodowli wyjściowych zawierających wszystkie morfotypy wytwarzane przez poszczególne szczepy.

Zdolność wytwarzania biofilmu wykazało wszystkie 20 szczepów należących do grupy porównawczej, wszystkie 40 hodowle wyjściowe badanych szczepów, wszystkie 39 izolatów morfotypu pomarszczonego, wszystkie 16 izolatów morfotypu krateropodobnego oraz wszystkie 16 izolatów prezentujące morfotyp koncentryczny. Brak zdolności wzrostu w postaci biofilmu stwierdzono u 5 izolatów należących do morfotypu gładkiego. Maksymalną zdolność wytwarzania biofilmu wykryto u 76 wśród 164 izolatów (46,3%), dodatnią zdolność wytwarzania biofilmu stwierdzono u 37 wśród 164 izolatów (22,6%), słabo dodatnią zdolność wytwarzania biofilmu stwierdzono u 24 wśród 164 badanych izolatów (14,6%), minimalną zdolność wytwarzania biofilmu stwierdzono u 22 wśród 164 izolatów (13,4%), brak zdolności wytwarzania biofilmu stwierdzono u 5 wśród 164 przebadanych izolatów (3,1%).

Rycina 6 obrazuje zdolność wzrostu w postaci biofilmu wykrytą wśród hodowli wyjściowych zawierają-

cych wszystkie formy fenotypowe charakterystyczne dla danego szczepu, izolatów o morfotypie gładkim, pomarszczonym, krateropodobnym, koncentrycznym oraz szczepów należących do grupy porównawczej.

ANALIZA STATYSTYCZNA WYNIKÓW

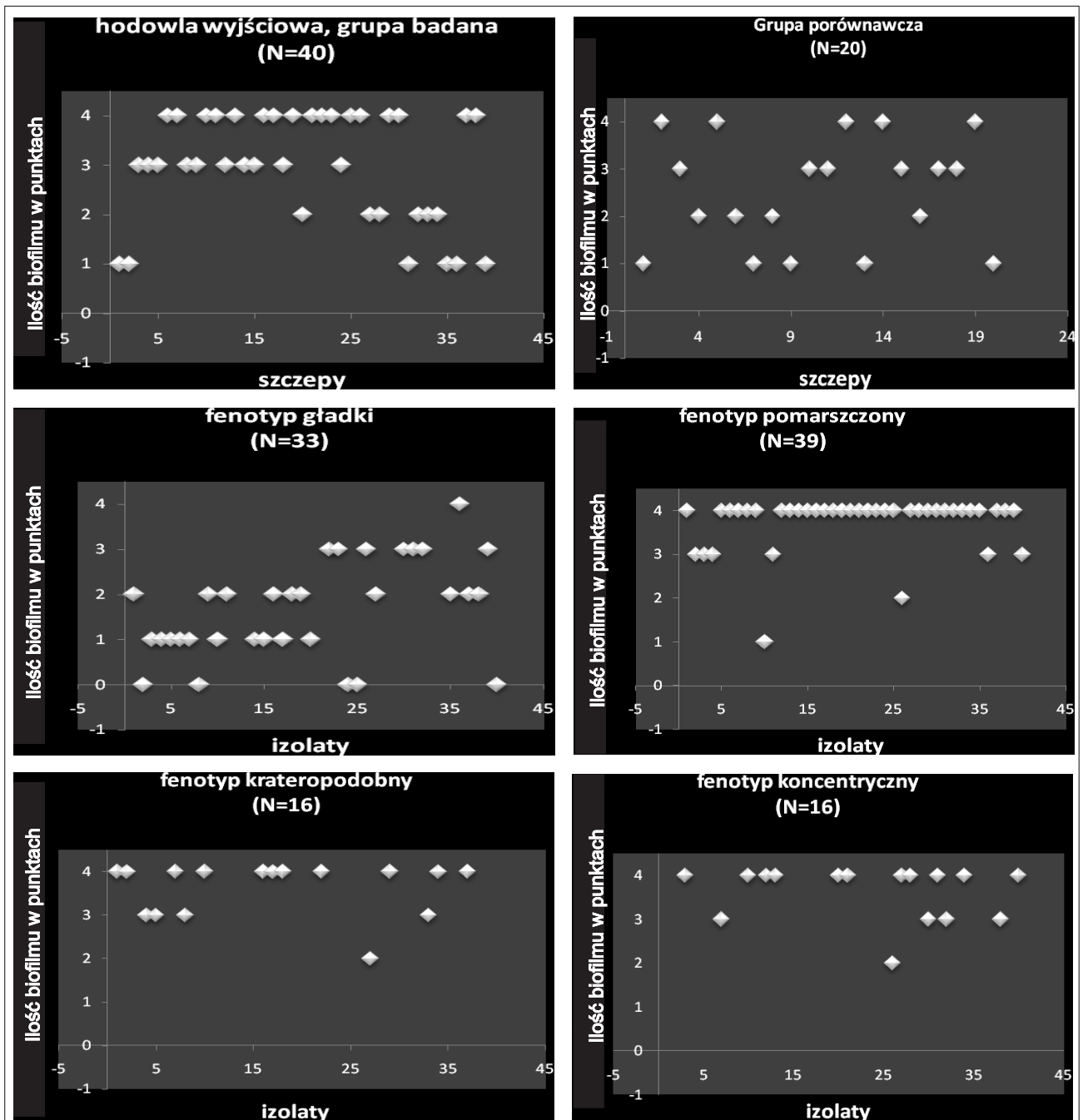
Istotne różnice statystyczne stwierdzono w wynikach badania zdolności wytwarzania biofilmu dla morfotypu gładkiego w porównaniu z morfotypem pomarszczonym (hisq = -6,37; $P < 0,001$), morfotypu gładkiego w porównaniu z morfotypem krateropodobnym (Chisq = -4,83; $P < 0,001$) morfotypu gładkiego w porównaniu z morfotypem koncentrycznym (Chisq = -4,83; $P < 0,001$).

Największą zdolność wzrostu w postaci biofilmu zaobserwowano wśród izolatów morfotypu pomarszczonego. Nie stwierdzono różnicy w zdolności wytwarzania biofilmu wśród szczepów z hodowli pierwotnych, wzrastających w postaci jednie morfotypu gładkiego (grupa porównawcza) i szczepów wzrastających w postaci morfologicznie zróżnicowanych kolonii (wyjściowe hodowle grupy badanej).

DYSKUSJA

Fenomen *phenotypic switching* (transformacja fenotypu) obserwowano u szczepów i hodowli wyjściowych oraz morfotypów *Candida parapsilosis*.

Izolaty <i>Candida parapsilosis</i>		Zdolność wytwarzania biofilmu w punktach				
		maksymalna 4 pkt	dodatnia 3 pkt	sł. dodatnia 2 pkt	minimalna 1 pkt	brak 0 pkt
Grupa porównawcza		5	6	4	5	0
Grupa badana	hodowla wyjściowa	17	10	7	6	0
	morfotyp gładki	1	7	10	10	5
	morfotyp pomarszczony	31	6	1	1	0
	morfotyp krateropodobny	11	4	1	0	0
	morfotyp koncentryczny	11	4	1	0	0
Izolaty ogółem 164 (100%)		76 (46,3%)	37 (22,6%)	24 (14,6%)	22 (13,4%)	5 (3,1%)



Ryc. 6. Zdolność wzrostu w postaci biofilmu wykrytą wśród hodowli wyjściowych zawierających wszystkie formy fenotypowe charakterystyczne dla danego szczepu, izolatów o morfotypie gładkim, pomarszczonym, krateropodobnym, koncentrycznym oraz szczepów należących do grupy porównawczej.

powia kolonii w obrębie jednego szczepu) obserwowany u grzybów drożdżopodobnych po raz pierwszy został opisany dla *Candida albicans* przez B. Slutsky i wsp., którzy opublikowali w *Science* w 1985 roku wyniki badań, opisujących siedem odmian morfologicznych kolonii na Sabouraud Agar (22). Spontaniczna konwersja z najbardziej pospolitej okrągłej formy kolonii (*smooth*) w nieregularne, gwiazdopodobne, pomarszczone, kapeluszopodobne, z punktowymi wgłębieniami oraz „kędzierzawe” kształty (*star*, *ring*, *irregular wrinkle*, *hat*, *stripple*, *fuzzy*) była obserwowana z częstotliwością $1,4 \times 10^{-4}$. Przy naświetlaniu hodowli małymi dawkami światła UV, które niszczyły

10% komórek, częstotliwość ta zwiększała się do 2×10^{-2} . Nowo nabyte cechy morfologiczne kolonii charakteryzowały się stabilnością i podlegały dziedziczeniu (22). Wyniki tego badania otworzyły nowy kierunek w mikrobiologii: odmienność morfologiczną oraz niejednorodność innych cech fenotypowych w obrębie jednego szczepu została stwierdzona nie tylko u grzybów drożdżopodobnych, ale również u bakterii.

Przedstawiana praca jest prawdopodobnie pierwszym badaniem w Polsce nad zmiennością fenotypową kolonii klinicznych szczepów grzybów drożdżopodobnych. Czynnikiem, który zainspirował

przeprowadzenie niniejszego eksperymentu była zaobserwowana podczas rutynowej diagnostyki mikologicznej różnorodność morfologii kolonii, które wytwarzają na Saboraud Dextrose Agar szczepy *Candida parapsilosis*. Większość szczepów wzrasta w postaci okrągłych, gładkich kolonii; mniej liczne szczepy wytwarzają kolonie nieregularne, pofałdowane, wznoszące się nad podłożem; niektóre szczepy tworzą kolonie o odmiennej budowie, sprawiając wrażenie ko-kolonizacji różnymi gatunkami drożdżaków w jednej hodowli. Po dokonaniu izolacji kolonii o odmiennej strukturze oraz przeprowadzeniu identyfikacji biochemicznej, stwierdzono przynależność ich do gatunku *Candida parapsilosis*. Dokonano również próby ustalenia odmienności innych cech fenotypowych. Wyniki badania pilotażowego były opublikowane w kwartalniku „Mikologia Lekarska” w 2008 roku (23). Odmiany morfologiczne kolonii wyizolowane z jednego szczepu klinicznego *Candida parapsilosis* pozostawały niezmiennie, niezależnie od ilości pasażu oraz warunków hodowli. Pozwoliło to otrzymać czyste hodowle morfotypów kolonii wyizolowanych z jednego szczepu klinicznego, które były wykorzystywane w dalszych badaniach. Dokonano próby poszukiwania odrębności innych cech fenotypowych: wzorów asymilacji cukrów oraz zdolności wytwarzania środowiska biofilmu.

Częstość transformacji fenotypowej oraz indukcja tego zjawiska nie była przedmiotem przedstawianego badania. Obserwacje dotyczyły szczepów klinicznych, stanowiących czynniki etiologiczne zakażeń i/lub kolonizacji. Cecha zdolności do morfogenezy prawdopodobnie jest cechą wrodzoną i decydującą o charakterze interakcji z makroorganizmem oraz stopniu inwazyjności zakażenia. Zagadnienie to wymaga niewątpliwie dalszych obserwacji, ponieważ nie wszystkie szczepy kliniczne *Candida parapsilosis* w hodowli pierwotnej wytwarzają alternatywne formy kolonii, a dotyczy to około 16% wyhodowanych szczepów. Dotychczas nie wyjaśniono, jakie mechanizmy leżą u podstawy tego zjawiska.

Zjawisko *phenotypic switching* zostało opisane dla różnych gatunków grzybów drożdżopodobnych: przede wszystkim dla *Candida albicans* oraz dla *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida lusitanae*, *Cryptococcus neoformans*, *Trichosporon asahii* (24, 25, 26, 37). Jednak stan aktualnej wiedzy nie pozwala na sformułowanie jednoznacznych odpowiedzi na wiele pytań dotyczących jego mechanizmów.

D.R. Soll i wsp. stwierdzili w swoich badaniach nad szczepami *Candida albicans*, które wyizolowali od pacjentek z nawracającym drożdżakowym zapaleniem pochwy, że wszystkie nawroty zakażenia były wywołane tym samym szczepem co zakażenie pierwotne, a morfologia kolonii w hodowli z wymazu z pochwy ulegała zmianie w kolejnych epizodach nawrotu zakażenia. Z wymazu z pochwy wyhodowano kolonie o morfologii innej niż w poprzednich epizodach choroby, mimo udowodnionej genetycznej identyczności szczepów za pomocą metody *Southern blot hybridization* (38). Wynikiem innych badań było stwierdzenie, że szczep-

py *Candida albicans* izolowane z materiałów klinicznych pacjentów z objawowym zakażeniem posiadają zdolność do *phenotypic switching* o większej częstotliwości niż szczepy kolonizujące (39). Szczepy powodujące zakażenia inwazyjne mają większą zdolność wzrostu w postaci kolonii o zróżnicowanej budowie niż szczepy pochodzące z zakażeń powierzchniowych (40). Wyniki otrzymane w przedstawianej pracy są zgodne z ww. wynikami. Szczepy wykazujące zdolność wzrostu w postaci zróżnicowanych morfologicznie kolonii w hodowli wyjściowej pochodzą z materiałów klinicznych pacjentów z objawowym zakażeniem drożdżakowym lub stałą kolonizacją, którą można zaklasyfikować jako przetrwałe subkliniczne zakażenie u chorych należących do grup ryzyka.

Wyniki otrzymane w przedstawianej pracy są zgodne z wynikami innych autorów. Lott i wsp. (41), Enger i wsp. (42) i Laffey and Butler (24), którzy opisują zjawisko *phenotypic switching* – zmienność morfologiczną kolonii w obrębie jednego szczepu *Candida parapsilosis*. Enger i wsp. (42) opisują pięć morfotypów kolonii uzyskanych z jednego szczepu: *smooth*, *crepe*, *concentric*, *snowball*, *rough*. Wśród szczepów przeanalizowanych w niniejszej pracy przeważały formy *smooth* (gładki) i *crepe* (pomarszczony), mniej liczna grupa została sklasyfikowana jako *concentric* (koncentryczny), żadnego izolatu nie udało się sklasyfikować jako *snowball* i *rough*. Czwarty morfotyp, nazwany crater (krateropodobny) jest swoistym połączeniem *snowball* i *rough*, co jest absolutnie zgodne z wynikami Laffey and Butler (24). Jednak w cytowanych wynikach badań dotyczących zmienności fenotypowej szczepów *Candida parapsilosis* obserwacje dotyczyły znacznie mniej licznych grup szczepów, niż w przedstawianej pracy.

Badania wzorów asymilacyjnych cukrów dla poszczególnych form morfologicznych kolonii wykazały statystycznie istotne różnice w wynikach testów zdolności asymilacji D-trehalozy, D-rybozy oraz kwasu lewulinowego. Szczególnie interesującym wydaje się wynik testu asymilacji trehalozy, który znacznie wybiega poza zakres procentowy reakcji użytych w teście ID32C dla identyfikacji gatunku *Candida parapsilosis*. W tabeli identyfikacyjnej testu ID 32 C dla *Candida parapsilosis* procent pozytywnych reakcji asymilacji tego substratu szacuje się na 96% przy 24/48 godzinach inkubacji w 29°C ± 2°C. Wśród izolatów gładkiej formy fenotypowej oraz szczepów grupy porównawczej wynik testu jest w 100% dodatni. Wśród morfotypów innych niż gładki jest on zmienny – z różną częstotliwością, w zależności od formy fenotypowej obserwowane są zarówno testy dodatnie, jak i ujemne oraz nieokreślone. Większość szczepów o morfotypie pomarszczonym jest „trehalozo-ujemna”, nie posiada zdolności asymilacji trehalozy. Wśród szesnastu izolatów o morfotypie krateropodobnym sześć zidentyfikowano jako szczepy „trehalozo-ujemne”, sześć – jako „trehalozo-dodatnie” (37,5%), cztery izolaty wykazywały zmienną zdolność asymilacji tego substratu. Spośród szesnastu izolatów o fenotypie koncentrycznym dziewięć posiadało zdolność asymilacji trehalozy, cztery wykazują brak

zdolności asymilacji tego substratu, dla trzech izolatów uzyskano wynik niepewny. Zmienna zdolność asymilacji trehalozy jest najważniejszą cechą biochemiczną, którą różni się morfotypy *Candida parapsilosis*.

Jednym z najważniejszych mechanizmów obronnych gospodarza przed zakażeniem grzybami oportunistycznymi jest fagocytoza, w której istotną rolę pełnią złożone czynniki lizosomalne, szczególnie w mechanizmie wymagającym tlenu: halogenizacja cząsteczek mikroorganizmu z udziałem układu mieloperoksydazy oraz wytwarzanie wysoce aktywnych rodników tlenowych (utlenianie) (43). Ponadto, wolne rodniki tlenowe są zaangażowane w wiele mechanizmów obronnych gospodarza przed zakażeniem drożdżakowym (44-46). Akumulacja trehalozy przez grzyby drożdżopodobne, co zostało udowodnione przez wiele autorów, jest szybkim mechanizmem protekcyjnym przed wieloma uszkadzającymi czynnikami, włącznie z substancjami utleniającymi (47, 48). W pracy Martinez-Esparza i wsp. udowodniono, że obecność trehalozy w komórce *Candida albicans* jest jednym z czynników zabezpieczających komórkę przed lizosomalnymi enzymami makrofagów (49). Zmienna zdolność asymilacji trehalozy może być związana ze zróżnicowaną zdolnością różnych morfotypów drożdżaków do przeżycia wewnątrz makrofagów.

Kolejnym problemem podjętym w pracy była ocena zdolności wzrostu w postaci biofilmu wśród morfotypów klinicznych szczepów *Candida parapsilosis*. Morfotyp pomarszczony, dla którego charakterystyczną cechą jest wytwarzanie dużej ilości pseudostrzępek, posiada największą zdolność do produkcji biofilmu. Najmniejszą zdolność wytwarzania biofilmu stwierdzono wśród izolatów morfotypu gładkiego. Morfotypy krateropodobny i koncentryczny prezentowały ekspresję tej cechy na bardzo zbliżonym poziomie. Otrzymane wyniki badań można uznać za zgodne z wynikami Laffey SF i Butler G (24). Zarówno w badaniu własnym, jak i w cytowanych badaniach największą zdolność wytwarzania biofilmu prezentują pseudostrzępkowe formy fenotypowe (24).

Zdolność wytwarzania biofilmu jest uzależniona od wrodzonej zdolności szczepów *Candida parapsilosis* do morfogenezy (przemiany z formy drożdżakowej w formę pseudostrzępkową), co można obserwować w hodowlach *in vitro* jako transformację fenotypową kolonii. Kolonie o gładkiej okrągłej budowie są wytwarzane przez komórki o typowo drożdżakowym kształcie.

Morfotyp ten prezentuje najmniej rozwiniętą zdolność wytwarzania środowiska biofilmu. Kolonie morfotypu pomarszczonego są tworzone przez liczne pseudostrzęпки, które można obserwować w preparatach mikroskopowych pochodzących z kolonii o takiej budowie. Morfotyp pomarszczony posiada największą zdolność produkcji biofilmu spośród wszystkich fenotypów charakterystycznych dla *Candida parapsilosis* i jest niezbędny do wykształcenia środowiska dojrzałego biofilmu (20). Prawdopodobnie, w przeprowadzonym eksperymencie, ustalającym zdolność grzybów drożdżopodobnych do wytwarzania biofilmu za pomocą metody spektrofotometrycznej przy użyciu płynnego podłoża Sabourauda ze zwiększoną suplementacją glukozy, procesy związane z morfogenezą zostały zintensyfikowane oraz przebiegały *in situ*, na powierzchni mikroprobówki płytki titracyjnej bez możliwości obserwacji mikroskopowej zmian w strukturze komórek.

W związku z tym nasuwa się wniosek, że zdolność wytwarzania biofilmu jest cechą charakterystyczną dla gatunku *Candida parapsilosis*, posiadają ją kliniczne szczepy niezależnie od ilości wariantów morfologicznych kolonii obserwowanych w posiewie wyjściowym. Wniosek ten jest wnioskiem wstępnym, ponieważ do oceny zdolności wytwarzania biofilmu była wykorzystana tylko jedna metoda, oparta na indukcji produkcji biofilmu poprzez pożywkę o zwiększonym stężeniu glukozy. Dane te, niewątpliwie, wymagają potwierdzenia z zastosowaniem innych metod.

WNIOSKI

1. Zjawisko zmienności fenotypowej występuje u około 16% pierwotnych hodowli *Candida parapsilosis* uzyskiwanych z materiałów klinicznych.
2. Kliniczne szczepy *Candida parapsilosis* posiadają zdolność wzrostu w postaci czterech stabilnych, podlegających dziedziczeniu morfotypów: gładki, pomarszczony, krateropodobny, koncentryczny.
3. Morfotypy izolowane ze szczepów klinicznych *Candida parapsilosis* charakteryzują się odmiennością cech fenotypowych: zmienną zdolnością asymilacji trehalozy, D-rybozy oraz kwasu lewulinowego.
4. Morfotypy izolowane ze szczepów klinicznych *Candida parapsilosis* charakteryzują się zróżnicowaną zdolnością wytwarzania środowiska biofilmu.

P I Ś M I E N N I C T W O

1. Ashford BK: Certain conditions of the gastrointestinal tract in Puerto Rico and their relation to tropical sprue. *Am J Trop Med Hyg* 1928; 8: 507-538.
2. Diekema DJ, Messer SA, Hollis RJ et al.: An outbreak of *Candida parapsilosis* prosthetic valve endocarditis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1997; 29: 147-153.
3. Wingard JR: Importance of *Candida* species other than *C. albicans* as pathogens in oncology patients. *Clin Infect Dis* 1995; 20: 115-125.
4. Pic Alauas L, Donegan N: Risk factors for candidemia caused by non-albicans *Candida* spp. Abstract No 321, Abstracts of the IDSA 36th Annual Meeting. *Clin Infect Dis* 1998; 27: 981.
5. Swoboda-Kopce E, Netsvetyayeva I, Sikora M et al.: The etiolo-

gical factors of fungemia and the susceptibility of fungal strains isolated from patients hospitalized in The Infant Jesus Clinical Hospital in Warsaw. Abstract Book 43rd Kongres of the Society for Surgical Research British Journal of Surgery 2008; 95: 97.

6. Krcmery V, Barnes AJ: Non-albicans spp. causing fungemia: pathogenicity and antifungal resistance. *J Hosp Inf* 2002; 50: 243-260.
7. Viscosi C, Girmenia C, Marinus A et al.: Invasive Fungal Infection Group of the European Organization for Research and Treatment of Cancer. Candidemia in cancer patients: A prospective, multicenter surveillance study by the Invasive Fungal Infection Group (IFIG) of the European Organization for Research and Treatment

- of Cancer (EORTC). Clin Infect Dis 1999; 28: 1071-1079.
8. Zarys mikologii lekarskiej. Pod red. prof. Berana E, Volumes, Wrocław, 1998. 274,299,375,381,382,411,413,414,465.
9. Girmenia C, Martino P, De Bernardis F et al.: Rising incidence of *Candida parapsilosis* fungemia in patients with hematologic malignancies: clinical aspects, predisposing factors and differential pathogenicity of the causative strains. Clin Infect Dis 1996; 23: 506-514.
10. Levy I, Rubin LG, Vasishtha S, Tucci VS: Emergence of *Candida parapsilosis* as the predominant species causing candidemia in children. Clin Infect Dis 1998; 26: 1086-1088.
11. Wong PN, Mak SK, Tong GM, Wong AK: A retrospective study of seven cases of *Candida parapsilosis* peritonitis in CAPD patients: the therapeutic implications. Perit Dial Int 2000; 20: 76-79.
12. Forrest GN, Weekes E, Johnsons JK: Increasing incidence of *Candida parapsilosis* candidemia with caspofungin usage. J Infect 2008; 56: 126-129.
13. Kuhn DM, Mukherjee PK, Clark TA et al.: *Candida parapsilosis* characterization in an outbreak setting. Emerg Infect Dis 2004; 10: 1074-1081.
14. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA: Medical Microbiology, 6th Edition 2009 by Mosby, Inc., an affiliate of Elsevier Inc.: 686.
15. Dzierżanowska D: Zakażenia grzybicze – wybrane zagadnienia. Wydawnictwo α-medica press 2006; 42-44.
16. Odds EC: Switch of phenotype as an escape mechanism of the intruder. Mycoses 1997; 4: 9-12.
17. Kayser FH, Bienz KA, Eckert J, Zinkernagel RM: Mikrobiologia lekarska, PZWŁ 2007; s. 151.
18. O'Toole GA, Kaplan H, Kolter R: Biofilm formation as microbial development. Annu Rev Microbiol 2000; 54: 49-79.
19. Dworecka-Kaszak B: Czy grzyby plotkują? Signaling i quorum sensing – zjawiska warunkujące komunikację drobnoustrojów. Mikologia Lekarska 2008; 15: 164-171.
20. Blankenship JR, Mitchell AP: How to build a biofilm: a fungal perspective. Curr Opin Microbiol 2006; 9: 588-594.
21. Shin JH, Kee SJ, Shin MG et al.: Biofilm production by isolates of *Candida* species from nonneutropenic patients: comparison of bloodstream isolates with isolates from other sources. J Clin Microbiol 2002; 40: 1244-1248.
22. Slutsky B, Buffo J and Soll DR: High-frequency switching of colony morphology in *Candida albicans*. Science 1985; 230: 666-669.
23. Netsvetyayeva I, Swoboda-Kopeć E, Dąbkowska M et al.: Różnorodność fenotypowa klinicznych szczepów *Candida parapsilosis*. Mikologia Lekarska 2008; 15: 131-134.
24. Laffey SF and Butler G: Phenotype switching affects biofilm formation by *Candida parapsilosis*. Microbiology 2005; 151: 1073-1081.
25. Ichikawa T, Sugita T, Yokoyama K et al.: Phenotypic switching and β -N-acetylhexosaminidase activity of the pathogenic yeast *Trichosporon asahii*. Microbiol Immun 2004; 48: 237-242.
26. Geiger J, Wessels D, Lockhart SR, and Soll DR: Release of a potent polymorphonuclear leukocyte chemoattractant is regulated by white-opaque switching in *Candida albicans*. Infect Immun 2004; 72: 667-677.
27. Soll DR, Lockhart SR and Zhao R: Relationship between switching and mating in *Candida albicans*. Eukaryot Cell 2003; 2: 390-397.
28. Lan CY, Newport LA, Murillo T et al.: Metabolic specialization associated with phenotypic switching in *Candida albicans*. PNAS 2002; 99: 14907-14912.
29. Andaluz E, Calderone R, Reyes G, Larriba G: Phenotypic analysis and virulence of *Candida albicans* LIG4 mutants. Infect Immun 2001; 69: 137-147.
30. Vargas K, Messer SA, Pfaller M et al.: Elevated phenotypic switching and drug resistance of *Candida albicans* from Human Immunodeficiency Virus-positive individuals prior to first thrush episode. J Clin Microbiol 2000; 38: 3595-3607.
31. Brockert PJ, Lachke A, Srikantha T et al.: Phenotypic switching and mating type switching of *Candida glabrata* at sites of colonization. Infect Immun 2003; 71: 7109-7118.
32. Yoon SA, Vazques PE, Steffan PE et al.: High-frequency, in vitro reversible switching of *Candida lusitanae* clinical isolates from amphotericin B susceptibility to resistance. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43: 836-845.
33. Jain N, Li L, McFadden DC et al.: Phenotypic switching in a *Cryptococcus neoformans* variety gatti strain is associated with changes in virulence and promotes dissemination to central nervous system. Infect Immun 2006; 74: 896-903.
34. Guerrero A, Jain N, Goldman DL, Fries BC: Phenotypic switching in *Cryptococcus neoformans*. Microbiology 2006; 152: 3-9.
35. Fries BC, Cook E, Wang X, Casadevall A: Effects of antifungal interventions on the outcome of experimental infections with phenotypic switch variants of *Cryptococcus neoformans*. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49: 350-357.
36. Fries BC, Taborda CP, Serfass E, Casadevall A: Phenotypic switching of *Cryptococcus neoformans* occurs *in vivo* and influences the outcome of infection. J Clin Invest 2001; 108: 1639-1648.
37. Karashima R, Yamakami Y, Yamagata E et al.: Increased release of glucuronoxylomannan antigen and induced phenotypic changes in *Trichosporon asahii* by repeated passage in mice. J Med Microbiol 2002; 51: 423-432.
38. Soll DR, Galask R, Isley S et al.: Switching of *Candida albicans* during successive episodes of recurrent vaginitis. J Clin Microbiol 1989; 27: 681-690.
39. Hellstein J, Vawter-Hugart H, Fotos P et al.: Genetic similarity and phenotypic diversity of commensal and pathogenic strains of *Candida albicans* isolated from oral cavity. J Clin Microbiol 1993; 31: 3190-3199.
40. Jones S, White G and Hunter PR: Increased phenotypic switching in strains of *Candida albicans* associated with invasive infections. J Clin Microbiol 1994; 32: 2869-2870.
41. Lott TJ, Kuykendall RJ, Welbel SF et al.: Genomic heterogeneity in the yeast *Candida parapsilosis*. Curr Genet 1993; 23: 463-467.
42. Enger L, Joly S, Pujol C et al.: Cloning and characterization of a complex DNA fingerprinting probe for *Candida parapsilosis*. J Clin Microbiol 2001; 39: 658-669.
43. Murphy J: Mechanisms of natural resistance to human pathogenic fungi. Annu Rev Microbiol 1991; 45: 509-538.
44. Kobayasi D, Kondo K, Uehara N et al.: Endogenous Reactive Oxygen Species Is an Important Mediator of Miconazole Antifungal Effect. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46: 1313-1316.
45. Lupetti A, Paulusma-Annema A, Senesi S et al.: Internal thiols and reactive oxygen species in candidacidal activity exerted by an N-terminal peptide of human lactoferrin. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46: 1634-1639.
46. Brakebusch M, Wintergerst U, Petropoulou T et al.: Bromelain is an accelerator of phagocytosis, respiratory burst and killing of *Candida albicans* by human granulocytes and monocytes. Eur J Med Res 2001; 6: 193-200.
47. Estruch F: Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. FEMS Microbiol Rev 2000; 24: 469-486.
48. Arguelles JC: Novel bifunctional trehalose synthase. Arch Microbiol 2000; 174: 217-224.
49. Martinez-Esparza M, Aguinaga A, Gonzales-Parraga P et al.: Role of trehalose in resistance to macrophage killing: study with a tps1/tps1 trehalose-deficient mutant of *Candida albicans*. Clin Microbiol Infect 2007; 13: 384-394.

otrzymano/received: 18.08.2011
zaakceptowano/accepted: 14.09.2011

Adres/address:
*Irina Netsvetyayeva
Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej
Warszawski Uniwersytet Medyczny
ul. Chałubińskiego 5, 02-044 Warszawa
tel.: 604-336-193
e-mail: irenanets@gmail.com