

# Actividad in vitro de la anfotericina B y la anidulafungina sobre biopelículas de *Candida albicans* y *Candida tropicalis*

Amparo Valentín<sup>1</sup>, Emilia Cantón<sup>1</sup>, Javier Pemán<sup>2</sup> y Guillermo Quindós<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Unidad de Microbiología Experimental, Centro Investigación y <sup>2</sup>Servicio de Microbiología, Hospital Universitario La Fe, Valencia. <sup>3</sup>Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina y Odontología; Universidad del País Vasco, Bilbao

## Resumen

Las infecciones invasoras producidas por *Candida* spp. han aumentando considerablemente y se están convirtiendo en una causa importante de morbilidad y mortalidad en pacientes inmunocomprometidos. Un gran número de manifestaciones de las candidiasis están relacionadas con la formación de biopelículas sobre dispositivos y materiales médicos. Las biopelículas de *Candida* spp. son refractarias al tratamiento antifúngico convencional. El objetivo de este estudio es doble: 1) determinar la prevalencia de aislamientos productores de biopelícula a partir de cepas procedentes de catéter (16 *C. albicans*) y de hemocultivo (dos *C. albicans* y 30 *C. tropicalis*) y, 2) determinar la actividad de la anfotericina B y la anidulafungina sobre biopelículas de *C. albicans* y *C. tropicalis* de 24 y 48 h de maduración. La producción de biopelícula y la actividad de los antifúngicos sobre las biopelículas se determinó mediante el ensayo de reducción de una sal de tetrazolio (XTT). Un 62,5% de los aislamientos de catéter y un 56,25% de los procedentes de hemocultivo produjeron biopelícula. Por especies, un 68,42% de los aislamientos de *C. albicans* y un 53,33% de los de *C. tropicalis* formaron biopelícula. Las biopelículas fueron más resistentes a la anfotericina y la anidulafungina que sus homólogas planctónicas. La eliminación completa de la biopelícula no se consiguió ni siquiera a las concentraciones más altas de antifúngicos ensayadas. La anidulafungina fue más activa que la anfotericina sobre biopelículas de *C. albicans* de 24 h de maduración (MG-CMIB<sub>2</sub> 0,354 frente a 0,686 µg/ml), pero no fue activa sobre biopelículas de *C. tropicalis*. Sin embargo, la anfotericina B fue más activa sobre las biopelículas de 48 h de maduración de ambas especies.

## Palabras clave

Anfotericina B, Anidulafungina, Biopelículas, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*

## In vitro activity of amphotericin B and anidulafungin against *Candida* spp. biofilms

## Summary

Invasive infections caused by *Candida* spp. are increasing worldwide and are becoming an important cause of morbidity and mortality in immunocompromised patients. A large number of manifestations of candidiasis are associated with the formation of biofilms on inert or biological surfaces. *Candida* spp. biofilms are recalcitrant to treatment with conventional antifungal therapies. The aim of this study was dual 1) to determine the prevalence of biofilm producers among clinical isolates from catheter (16 *C. albicans*) and blood culture (2 *C. albicans* and 30 *C. tropicalis*), and 2) to determine the activity of amphotericin B and anidulafungin against *C. albicans* and *C. tropicalis* biofilms of 24 and 48 hours of maturation. Biofilms were developed using a 96-well microtitre plate model and production and

### Dirección para correspondencia:

Dra. Emilia Cantón  
Unidad de Microbiología Experimental  
Centro Investigación,  
Hospital Universitario La Fe  
Avenida Campanar, 21  
46009-Valencia  
Tel.: +34 961973111  
Fax: +34 961973018  
E-mail: canton\_emi@gva.es

Aceptado para publicación el 17 de julio de 2007

activity of antifungal agents against biofilms were determined by the tetrazolium (XTT) reduction assay. Of catheter and blood isolates, 62.5 and 56.25%, respectively, produced biofilms. By species, 68.42% of *C. albicans* and 53.33% of *C. tropicalis* were biofilm producers. *C. albicans* biofilms showed more resistance to amphotericin B and anidulafungin than their planktonic counterparts. Complete killing of biofilms was never achieved, even at the highest concentrations of the drugs tested. Anidulafungin displayed more activity than amphotericin B against *C. albicans* biofilms of 24 hours of maturation (GM MIC 0.354 vs. 0.686 µg/ml), but against *C. tropicalis* biofilms amphotericin B was more active (GM MIC 11.285 vs. 0.476 µg/ml). In contrast, against biofilms with 48 hours maturation, amphotericin B was more active against both species.

**Key words** Amphotericin B, Anidulafungin, Biofilms, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*

Las biopelículas son comunidades microbianas embebidas en una matriz extracelular fundamentalmente polisacárida, altamente hidratada, comunicadas al exterior mediante canales de agua, y adheridas y desarrolladas sobre superficies biológicas e inertes. Esta forma de vida de los microorganismos adheridos a superficies se conoce desde hace mucho tiempo, pero no ha sido hasta hace poco cuando se ha visto su gran impacto médico e industrial [8,10-12,24,27,29,41].

Las células en las biopelículas poseen características diferentes de sus homólogas planctónicas (en suspensión), como son la comunicación intercelular o *quorum sensing* y el incremento de la resistencia a las defensas inmunológicas y a la acción de los antimicrobianos [8-12,34].

Muchas de las candidiasis se encuentran asociadas a la formación de biopelículas sobre catéteres, prótesis dentales, válvulas cardíacas protésicas y otros dispositivos biomédicos [13,21,35]. La mayor resistencia de las biopelículas de *Candida* al tratamiento antifúngico convencional hacen necesaria la retirada del dispositivo en numerosas ocasiones, con las serias implicaciones que esto conlleva [4,16,17,30,31].

Se ha observado un incremento sustancial de la resistencia de las biopelículas de *C. albicans* al fluconazol, la anfotericina B y otros antifúngicos [16,17], y una mayor eficacia de las formulaciones lipídicas de anfotericina B (liposomal y complejo lipídico) [23]. Las equinocandinas, que actúan inhibiendo la síntesis del β-1,3 glucano de la pared celular fúngica [1,36], han mostrado una actividad prometedora sobre la formación de biopelículas al ser dicho glucano una molécula esencial en la adhesión de *Candida* a las superficies [2,6,23,38-40].

La anidulafungina es una nueva equinocandina que se diferencia de caspofungina y micafungina en que no se metaboliza en el hígado, su degradación es química, posee un volumen de distribución equivalente al volumen acuoso total corporal y una semivida biológica más larga que sus congéneres [14,45]. Diversos estudios muestran una excelente actividad in vitro de la anidulafungina sobre *Candida* spp., con valores de concentración mínima inhibitoria (CMI) menores que los obtenidos con caspofungina y micafungina [1,7,15,29].

El propósito del presente estudio ha sido evaluar la capacidad para formar biopelículas de aislamientos de sangre de *C. albicans* y *Candida tropicalis* y, además, determinar la actividad in vitro de la anfotericina B y de la anidulafungina sobre estas biopelículas.

## Material y métodos

**Microorganismos.** Se estudiaron 48 aislamientos clínicos de *Candida* spp., 32 obtenidos de hemocultivo (dos *C. albicans* y 30 *C. tropicalis*) y 16 de catéter (*C. albicans*). Además, se incluyó la cepa de referencia *C. albicans* ATCC 90028. Todos los aislamientos procedían de pacientes ingresados en el Hospital Universitario La Fe de Valencia. La identificación de las cepas se realizó mediante la utilización de pruebas metabólicas (VITEK 2, bioMérieux, España, y AUXACOLOR 2, Bio-Rad, España).

**Formación de biopelículas.** Las biopelículas se obtuvieron según el método descrito por Ramage et al. [32] con ligeras modificaciones. A partir de un cultivo de 24 h de los aislamientos en agar glucosado de Sabouraud, se inoculó un tubo con medio de peptona, y extracto de levadura y glucosa (YPD, Sigma-Aldrich, España), que se incubó 24 h en agitación orbital a 30 °C y 100 rpm. Las células se cosecharon por centrifugación y lavaron con tampón fosfato salino estéril a pH 7,4 (PBS, Sigma-Aldrich), y se ajustaron a una concentración de  $1 \times 10^6$  ufc/ml en RPMI 1640 suplementado con L-glutamina y tamponado con ácido morfolino propano sulfónico (Sigma-Aldrich). Para permitir el desarrollo de las biopelículas, se añadieron 100 µl de esta suspensión celular a cada uno de los pocillos de microplacas estériles de poliestireno de fondo plano que, posteriormente, se incubaron durante 24 y 48 h a 37 °C. Tras la incubación, las placas se lavaron tres veces con PBS con la finalidad de eliminar las células no adheridas. La formación de biopelícula se verificó mediante el ensayo de reducción de sales de 2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolio-5-carboxanilida (XTT, Sigma-Aldrich) [18,42]. Para realizar esta cuantificación, se preparó una solución de XTT en lactato de Ringer (0,5 g/l) que después se filtró a través de un filtro de 0,22 µm y almacenó en alícuotas a -70 °C. Antes de cada ensayo, se descongelaba una alícuota de XTT y se le añadía menadiona 10mM en acetona (Sigma-Aldrich). A cada uno de los pocillos de la placa con la biopelícula se añadieron 100 µl de la solución XTT-menadiona. Las placas se incubaron en oscuridad a 37 °C durante 1 h, leyéndose la densidad óptica (DO) de cada pocillo con un espectrofotómetro a 492 nm. La determinación se realizó por cuadruplicado, considerándose cepas productoras de biopelícula aquellas con una  $DO \geq 0,200$ , una vez restada la densidad óptica del pocillo de control de esterilidad (blanco con medio RPMI).

Según la densidad óptica obtenida, los aislamientos se clasificaron como 6+ (DO  $\geq$  1,301), 5+ (DO 1,000-1,300), 4+ (DO 0,699-0,999), 3+ (0,398-0,699), 2+ (DO 0,222-0,398) y 1+ (DO  $\leq$  0,222) [43]

**Antifúngicos.** Se estudiaron la anfotericina B desoxicolato (Bristol-Myers Squibb, España) y la anidulafungina (Pfizer, España), obtenidos como polvo valorado de las respectivas empresas farmacéuticas. A partir de una solución madre de 1.600  $\mu\text{g/ml}$  en agua para la anfotericina B y en DMSO para la anidulafungina, se realizaron las diluciones posteriores en medio RPMI.

**Estudio de la sensibilidad in vitro a los antifúngicos.** La obtención de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de las células planctónicas se realizó siguiendo las directrices del CLSI (documento M27-A2) y utilizando *Candida parapsilosis* ATCC 22019 y *Candida krusei* ATCC 6258 como cepas de control de calidad [5]. La lectura se realizó de forma visual a las 24 y 48 h de incubación. La CMI para la anfotericina B se definió como la concentración más baja que produjo una reducción del 100% del crecimiento, mientras que para la anidulafungina, la CMI se definió como la mínima concentración que

produjo una reducción del crecimiento de, al menos, el 50% en comparación con el crecimiento control.

El estudio de la sensibilidad in vitro de las biopelículas a ambos antifúngicos se llevó a cabo mediante la utilización del ensayo de reducción de XTT. Se prepararon disoluciones dobles seriadas de los antifúngicos (0,03 a 16  $\mu\text{g/ml}$ ), que se añadieron a las biopelículas de 24 y 48 h de maduración, y se incubaron 48 h a 37 °C. La determinación se realizó por cuadruplicado, y al menos dos veces en días diferentes, incluyéndose siempre los pocillos de control de esterilidad y de control de crecimiento. La CMI de las células en la biopelícula se definió como la concentración más baja de antifúngico capaz de producir una reducción de la densidad óptica mayor o igual al 50% (CMIB<sub>50</sub>) y al 80% (CMIB<sub>80</sub>), respectivamente, en comparación al control de crecimiento.

**Análisis de los resultados.** Se calculó la media geométrica (MG) de las CMI de las células planctónicas y en biopelícula a las 24 y 48 h de maduración. Los valores fuera de escala (superiores a 16  $\mu\text{g/ml}$ ) se interpretaron como 16  $\mu\text{g/ml}$ . Para determinar la diferencia entre las medias se utilizó el test de la *t* de Student. Valores de *p* < 0,05 se consideraron significativos.

**Tabla 1.** Actividad in vitro ( $\mu\text{g/ml}$ ) de la anfotericina B y la anidulafungina sobre células planctónicas y sobre biopelículas de *C. albicans* y *C. tropicalis* de 24 y 48 h de maduración.

Aislamientos	Planctónica		Biopelícula							
	CMI		24 h maduración				48 h maduración			
			CMIB <sub>50</sub>		CMIB <sub>80</sub>		CMIB <sub>50</sub>		CMIB <sub>80</sub>	
AMB	AND	AMB	AND	AMB	AND	AMB	AND	AMB	AND	
ATCC 90028	0,5	$\leq$ 0,016	0,12	$\leq$ 0,03	1	>16	0,5	0,25	1	>16
Ca 03	0,5	$\leq$ 0,016	0,5	$\leq$ 0,03	4	>16	1	$\leq$ 0,03	8	>16
Ca 04	0,12	$\leq$ 0,016	0,5	0,06	4	>16	1	0,12	>16	>16
Ca 16	0,12	$\leq$ 0,016	0,5	$\leq$ 0,03	4	>16	0,5	>16	4	>16
Ca 17	0,12	$\leq$ 0,016	1	>16	8	>16	2	>16	8	>16
Ca 18	0,12	$\leq$ 0,016	2	0,12	>16	>16	2	>16	>16	>16
Ca 19	0,12	$\leq$ 0,016	2	>16	>16	>16	16	>16	>16	>16
Ca 20	0,12	$\leq$ 0,016	1	>16	4	>16	1	>16	4	>16
Ca 26	0,12	$\leq$ 0,016	1	$\leq$ 0,03	>16	>16	1	>16	>16	>16
Ca 29	0,12	$\leq$ 0,016	0,5	$\leq$ 0,03	>16	>16	1	0,25	>16	>16
Ca 39	0,12	$\leq$ 0,016	1	4	>16	>16	1	>16	>16	>16
Ca 44	0,12	$\leq$ 0,016	0,25	>16	4	>16	0,25	>16	4	>16
Ca 46	0,12	$\leq$ 0,016	1	$\leq$ 0,03	8	>16	1	0,06	8	>16
MG <i>C. albicans</i>	0,149	$\leq$ 0,016	0,686	0,354	6,817	>16	1,113	2,325	8	>16
Ct 14	0,5	$\leq$ 0,016	0,5	>16	>16	>16	1	>16	>16	>16
Ct 15	1	$\leq$ 0,016	0,5	>16	1	>16	0,5	>16	4	>16
Ct 20	0,5	$\leq$ 0,016	0,12	>16	>16	>16	0,5	>16	>16	>16
Ct 21	0,5	$\leq$ 0,016	0,25	>16	16	>16	0,25	>16	>16	>16
Ct 26	0,5	$\leq$ 0,016	0,12	>16	1	>16	0,12	>16	1	>16
Ct 27	0,5	$\leq$ 0,016	0,5	>16	>16	>16	0,5	>16	>16	>16
Ct 32	0,25	$\leq$ 0,016	0,25	>16	>16	>16	0,5	>16	>16	>16
Ct 36	0,03	$\leq$ 0,016	0,5	>16	>16	>16	2	>16	>16	>16
Ct 37	0,03	$\leq$ 0,016	0,5	>16	>16	>16	1	>16	>16	>16
Ct 39	0,03	$\leq$ 0,016	0,5	>16	>16	>16	0,5	>16	>16	>16
Ct 40	0,12	$\leq$ 0,016	0,5	>16	>16	>16	2	>16	>16	>16
Ct 42	0,25	$\leq$ 0,016	0,5	>16	>16	>16	1	>16	>16	>16
Ct 43	0,25	$\leq$ 0,016	2	0,06	>16	>16	4	>16	>16	>16
Ct 45	0,06	$\leq$ 0,016	2	>16	>16	>16	4	>16	>16	>16
Ct 46	0,12	$\leq$ 0,016	2	>16	>16	>16	2	>16	>16	>16
Ct 47	0,12	$\leq$ 0,016	0,25	>16	4	>16	4	>16	>16	>16
MG <i>C. tropicalis</i>	0,181	$\leq$ 0,016	0,476	11,285	10,375	>16	0,955	>16	12,338	>16

AMB: anfotericina B, AND: anidulafungina, Ca: *C. albicans*, Ct: *C. tropicalis*, MG: media geométrica, CMI: concentración mínima inhibitoria, CMIB: concentración mínima inhibitoria para la reducción de la densidad óptica de la biopelícula.

## Resultados

**Formación de biopelícula.** La capacidad para formar biopelículas se observó en 28 de los 48 aislamientos clínicos estudiados (58,3%) (Figura 1). Un 56,3% de los aislamientos de hemocultivo (los dos aislamientos de *C. albicans* y 16 de los 30 de *C. tropicalis*) y el 62,5% de los aislamientos de catéter (10 de los 16 aislamientos de *C. albicans*) desarrollaron biopelícula. En general, los valores de densidad óptica de las biopelículas de 48 h de maduración fueron superiores ( $p = 0,035$ ) a los obtenidos en las biopelículas de 24 h de maduración.

**Actividad in vitro de los antifúngicos sobre las células planctónicas.** En la tabla 1 se muestran los resultados de la actividad de los antifúngicos ensayados sobre las células planctónicas. Los valores de CMI de la anfotericina B sobre las células planctónicas oscilaron entre 0,03 y 1  $\mu\text{g/ml}$  (MG 0,166  $\mu\text{g/ml}$ ). Las CMI de anidulafungina fueron  $\leq 0,016 \mu\text{g/ml}$  para todos los aislamientos.

**Actividad in vitro de la anfotericina B sobre las biopelículas de *Candida*.** La CMIB<sub>50</sub> para las biopelículas de 24 h de maduración osciló entre 0,12 y 2  $\mu\text{g/ml}$  (MG 0,686  $\mu\text{g/ml}$  para *C. albicans* y 0,476  $\mu\text{g/ml}$  para *C. tropicalis*). La CMIB<sub>80</sub> osciló entre 1 y >16  $\mu\text{g/ml}$  y la MG fue de 6,817  $\mu\text{g/ml}$  para *C. albicans* y 10,375  $\mu\text{g/ml}$  para *C. tropicalis* (Tabla 1).

Sobre biopelículas de 48 h de maduración, los valores de CMIB<sub>50</sub> oscilaron entre 0,12 y 16  $\mu\text{g/ml}$  y los de CMIB<sub>80</sub> entre 1 y >16  $\mu\text{g/ml}$ . La MG de la CMIB<sub>50</sub> fue 1,113  $\mu\text{g/ml}$  para *C. albicans* y 0,955  $\mu\text{g/ml}$  para *C. tropicalis*, y la MG de la CMIB<sub>80</sub> fue 8  $\mu\text{g/ml}$  para *C. albicans* y 12,338  $\mu\text{g/ml}$  para *C. tropicalis* (Tabla 1). En la figura 2B se representa el porcentaje acumulado de la CMIB<sub>50</sub> de anfotericina B sobre biopelículas de *C. albicans* y *C. tropicalis* de 24 y 48 h de maduración. Con una concentración inferior o igual a 1  $\mu\text{g/ml}$  se inhibieron el 84,63% y el 81,25% de las biopelículas de 24 h de maduración (de *C. albicans* y *C. tropicalis*, respectivamente), y el 76,92% y el 62,50% de las de 48 h de maduración de cada especie, respectivamente.

**Actividad in vitro de la anidulafungina sobre las biopelículas de *Candida*.** A las 24 h de maduración, los

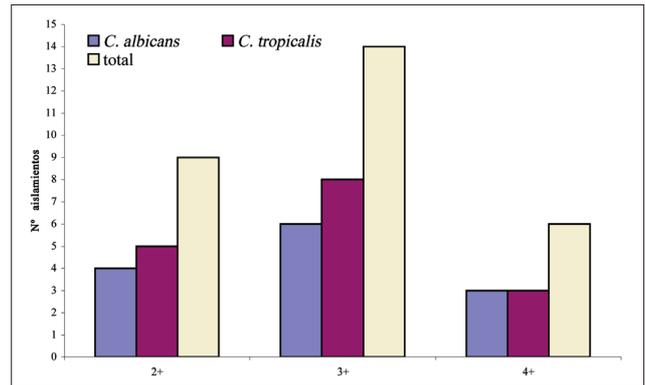


Figura 1. Distribución de los aislamientos de *Candida albicans* y *Candida tropicalis* según su capacidad de formar biopelículas.

resultados de CMIB<sub>50</sub> sobre las biopelículas de *C. albicans*, variaron entre  $\leq 0,03$  y > 16  $\mu\text{g/ml}$ , siendo la MG de 0,354  $\mu\text{g/ml}$ . Para *C. tropicalis* la CMIB<sub>50</sub> estuvo entre 0,06 y > 16  $\mu\text{g/ml}$ , con una MG de 11,285  $\mu\text{g/ml}$ . La CMIB<sub>80</sub> fue > 16  $\mu\text{g/ml}$  para todos los aislamientos (Tabla 1). Sobre las biopelículas de 48 h de maduración, la MG de la CMIB<sub>50</sub> fue 2,325  $\mu\text{g/ml}$  para *C. albicans* y > 16  $\mu\text{g/ml}$  para *C. tropicalis*. Los valores de CMIB<sub>80</sub> fueron > 16  $\mu\text{g/ml}$  para ambas especies (Tabla 1). En la figura 2A se representa el porcentaje acumulado de la CMIB<sub>50</sub> de anidulafungina sobre las biopelículas de *C. albicans* y *C. tropicalis* de 24 y 48 h de maduración. Para el 61,53% de los aislamientos de *C. albicans* y el 6,25% de los de *C. tropicalis* en biopelículas de 24 h de maduración, la CMIB<sub>50</sub> fue  $\leq 2 \mu\text{g/ml}$ ; con esta misma concentración se inhibieron el 38,45% de los aislamientos de *C. albicans* y ninguna de las biopelículas de 48 h de maduración de *C. tropicalis*.

## Discusión

Las candidiasis invasoras siguen representando una de las mayores causas de infección nosocomial [13,21,28]. Aproximadamente un 65% de estas infecciones nosocomiales se encuentran asociadas a la formación de biopelículas

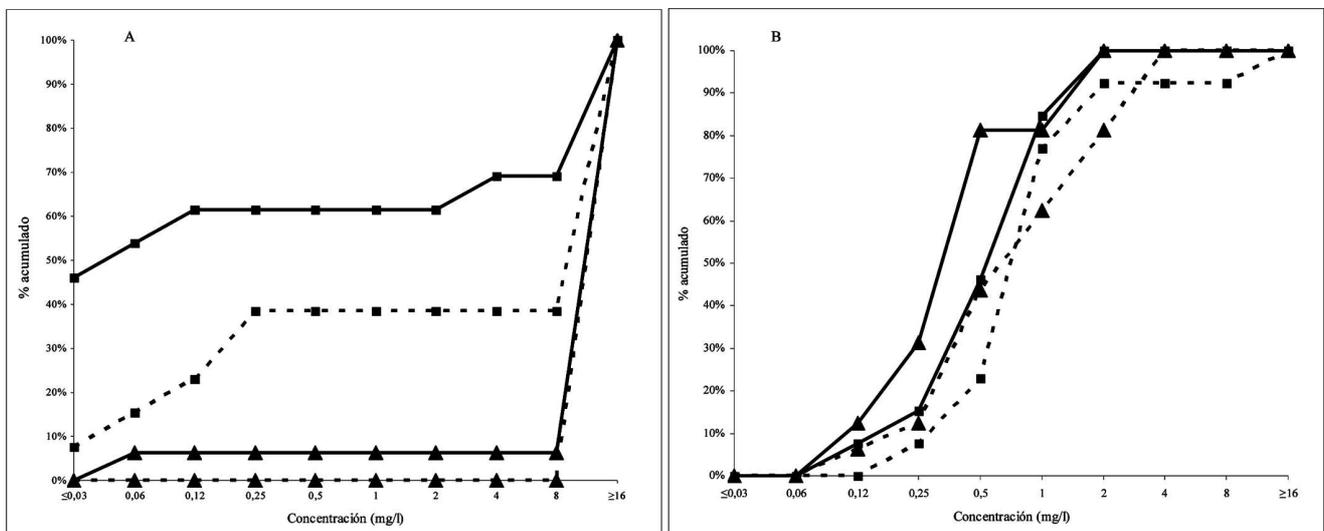


Figura 2. Porcentaje acumulado de biopelículas de *C. albicans* y *C. tropicalis* inhibidas por la anidulafungina (A) y la anfotericina B (B). Línea continua, biopelículas de 24 h de maduración; línea discontinua, biopelículas de 48 h de maduración. (■) *C. albicans*, (◆) *C. tropicalis*.

sobre dispositivos y materiales médicos, principalmente catéteres, sondas y prótesis [13]. Las células sésiles de las biopelículas son diferentes a sus homólogas planctónicas, incrementándose de manera considerable su resistencia a los antifúngicos y originando infecciones recalcitrantes al tratamiento [17,30,31]. Aunque existen varias técnicas para medir in vitro la formación de biopelículas y su sensibilidad a los antifúngicos, en nuestro estudio hemos utilizado el método propuesto por Ramage et al. [32]. Se trata de un método rápido, eficaz y reproducible, en el cual se forman biopelículas sobre microplacas estériles de poliestireno con fondo plano de 96 pocillos. Este método permite un análisis semicuantitativo de la actividad de los antifúngicos sobre las biopelículas mediante un ensayo colorimétrico, utilizando una sal de tetrazolio (XTT) que se convierte, por la acción de las deshidrogenasas mitocondriales de las células vivas, en un producto de color naranja soluble en agua que puede ser medido espectrofotométricamente [18,42].

La capacidad para formar biopelícula de los aislamientos estudiados fue similar con independencia de que procedieran de catéter (62,5%) o de hemocultivo (56,3%). Algunos estudios mencionan que hay una gran variabilidad en la producción de biopelícula entre aislamientos clínicos de orígenes anatómicos distintos [19]. En nuestro estudio, el 68,4% de los aislamientos de *C. albicans* y el 53,3% de los de *C. tropicalis* produjeron biopelícula coincidiendo con la mayor capacidad de *C. albicans* sobre otras especies de *Candida* para la formación de biopelículas [22].

La anfotericina B y la anidulafungina [1,3] son fármacos con gran actividad antifúngica, incluyendo las dos especies evaluadas en el presente estudio. La actividad de la anfotericina B y la anidulafungina fue mayor sobre las células planctónicas que sobre las biopelículas, y mayor sobre las biopelículas de 24 h de maduración. El mayor grado de organización de las biopelículas de 48 h y la dependencia de mecanismos de resistencia involucrados según la fase de formación de la biopelícula [25,33] pueden explicar esta diferente actividad antifúngica. Otros autores también han observado esta menor actividad de los antifúngicos sobre las biopelículas de 48 h de maduración, y es aconsejable especificar el tiempo de maduración de las biopelículas [6].

Es importante resaltar que ninguno de los antifúngicos fue capaz de eliminar completamente la actividad metabólica de las biopelículas. Se observó una mayor actividad de la anfotericina B sobre biopelículas de *C. albicans* y *C. tropicalis* de 24 h de maduración, y que los valores de MG de las CMIB<sub>50</sub> (< 1 µg/ml) se duplicaban al aumentar el tiempo de maduración. Además, los valores de MG de las CMIB<sub>80</sub> de anfotericina B, se elevaban de forma importante (> 6 µg/ml) con independencia del tiempo de maduración de las biopelículas.

La anidulafungina fue más activa que la anfotericina B tanto sobre las células planctónicas (CMI) como sobre las biopelículas de *C. albicans* de 24 h de maduración (MG CMIB<sub>50</sub> 0,354 µg/ml frente a 0,686 µg/ml). La anidulafungina no consiguió reducir el 50% de la biopelícula de 48 h de maduración de algunos aislamientos de *C. albicans*, pero sí se observó una disminución notable de su actividad metabólica con concentraciones de 1 µg/ml (32-43% de reducción). Sin embargo, la anidulafungina no mostró actividad sobre las biopelículas desarrolladas por la gran mayoría de los aislamientos de *C. tropicalis*.

Los resultados obtenidos con la anfotericina B son similares a los obtenidos por otros autores. Sin embargo, la comparación de nuestros resultados con los de otros autores resulta difícil ya que son escasos los trabajos de la actividad in vitro de la anidulafungina sobre biopelículas de *C. albicans* [20,37,44]. Otras equinocandinas, como caspofungina y micafungina han mostrado una actividad parecida a la anidulafungina con aislamientos de *C. albicans* [2,6,23,37,38,43].

En conclusión, la anidulafungina tiene una buena actividad antifúngica sobre biopelículas de *C. albicans* de 24 h de maduración, y esta actividad es mayor que la obtenida con la anfotericina B. Sin embargo, la anidulafungina muestra escasa actividad sobre biopelículas de los aislamientos estudiados de *C. tropicalis*.

*Agradecemos a los laboratorios Pfizer España la ayuda prestada para la realización de este trabajo. El trabajo ha sido parcialmente financiado con los proyectos PI050511 y PI061895 del Fondo de Investigación Sanitaria y GIU05/05 de la Universidad del País Vasco-Euskal Herriko Unibertsitatea.*

## Bibliografía

- Arévalo MP, Carrillo-Muñoz AJ, Salgado J, Cárdenas D, Brió S, Estivill D, Quindós G, Espinel-Ingroff A. Antifungal activity of the echinocandin Anidulafungin (VER002-6, LY-303366) against yeast pathogens: a comparative study with M27-A microdilution method. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51: 163-166.
- Bachmann SP, Vandewalle K, Ramage G, Patterson T, Wickes BL, Graybill JR, López-Ribot JL. *In vitro* activity of caspofungin against *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 3591-3596.
- Cantón E, Pemán J, Viudes A, Quindós G, Gobernado M, Espinel-Ingroff A. Minimum fungicidal concentrations of amphotericin B for bloodstream *Candida* species. *Diagnostic Microbiol Infect Dis* 2003; 45: 203-206.
- Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, McCormick T, Ghannoum MA. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: Development, architecture, and drug resistance. *J Bacteriol* 2001; 183: 5385-5394.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Approved standard. 2<sup>nd</sup> ed. CLSI document M27-A2. Wayne, PA, 2002.
- Cocquaud C, Rodier M-H, Daniault G, Imbert C. Anti-metabolic activity of caspofungin against *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* biofilms. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56: 507-512.
- Cota J, Carden M, Graybill JR, Najvar LK, Burgess DS, Wiederhold NP. *In vitro* Pharmacodynamics of anidulafungin and caspofungin against *Candida glabrata* isolates, including strains with decreased caspofungin susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 3926-3928.
- Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science* 1999; 284: 1318-1322.
- Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, Iglewski BH, Costerton JW, Greenberg EP. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* 1998; 280: 294-298.
- Donlan RM. Biofilm formation: A clinically relevant microbiological process. *Clin Infect Dis* 2001; 33: 1387-1392.
- Donlan RM, Costerton W. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15: 167-193.
- Donlan RM. Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis* 2002; 8: 881-890.
- Douglas LJ. Medical importance of biofilms in *Candida* infections. *Rev Iberoam Micol* 2002; 19: 139-143.
- Eraso E, Albaina O, Arechavala A, Sahand I, Carrillo-Muñoz A, Pontón J, Quindós G. Activity of micafungin against clinical isolates of *Candida* spp. and *Candida albicans* biofilms. The 16th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology. Paris, 2006. P-0069.
- Ghannoum M, D'Angelo M. Anidulafungin. A potent antifungal that targets *Candida* and *Aspergillus*. *Infect Dis in Clin Practice* 2005; 13: 165-178.
- Hawser SP, Douglas LJ. Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials *in vitro*. *Infect. Immun* 1994; 62: 915-921.
- Hawser SP, Douglas LJ. Resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents *in vitro*. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 2128-2131.
- Hawser SP, Norris H, Jessup CJ, Ghannoum MA. Comparison of a 2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-5-[(Phenyl-amino) carboxyl]-2H-tetrazolium hydroxide (XTT) colorimetric method with the standardized National Committee for Clinical Laboratory Standards method of testing clinical yeast isolates for susceptibility to antifungal agents. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 1450-1452.
- Jin Y, Yip HK, Samaranyake YH, Yau JY, Samaranyake LP. Biofilm-forming ability of *Candida albicans* is unlikely to contribute to high levels of oral yeast carriage in cases of human immunodeficiency virus infection. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 2961-2967.
- Katragkou A, Simitsopoulou M, Diza-Mataftsi E, Tsantali C, Rolidis E. *In vitro* activity of newer antifungal agents against *Candida albicans* biofilms. Presented at the 17<sup>th</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID) and 25<sup>th</sup> International Congress of Chemotherapy (ICC). Munich, 2007.
- Kojic EM, Darouiche RO. *Candida* infections of medical devices. *Clin Microbiol Rev* 2004; 17: 255-267.
- Kuhn DM, Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. *Infect Immun* 2002; 70: 878-888.
- Kuhn DM, Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. Antifungal susceptibility of *Candida* biofilms: Unique efficacy of amphotericin B lipid formulations and echinocandins. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 1773-1780.
- Kumamoto CA, Vines MD. Alternative *Candida albicans* lifestyles: growth on surfaces. *Annu Rev Microbiol* 2005; 59: 113-133.
- Mukherjee PK, 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. *Infect Immun* 2003; 71: 4333-4340.
- Ostrosky-Zeichner L, Rex JH, Pappas PG, Hamill RJ, Larsen RA, Horowitz HW, Powderly WG, Hyslop N, Kauffman CA, Cleary J, Mangino JE, Lee J. Antifungal susceptibility survey of 2,000 bloodstream *Candida* isolates in the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 3149-3154.
- O'Toole GA. To build a biofilm. *J Bacteriol* 2003; 185: 2687-2689.
- Pappas PG. Invasive candidiasis. *Infect Dis Clin North Am* 2006; 20: 485-506.
- Parsek MR, Singh PK. Bacterial biofilms: An emerging link to disease pathogenesis. *Annu Rev Microbiol* 2003; 57: 677-701.
- Ramage G, Wickes BL, López-Ribot JL. Biofilms of *Candida albicans* and their associated resistance to antifungal agents. *Am Clin Lab* 2001; 20: 42-44.
- Ramage G, Vandewalle K, Wickes BL, López-Ribot JL. Characteristics of biofilm formation by *Candida albicans*. *Rev Iberoam Micol* 2001; 18: 163-170.
- Ramage G, Vandewalle K, Wickes BL, López-Ribot JL. Standardized method for *in vitro* antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 2475-2479.
- Ramage G, Bachmann S, Patterson TF, Wickes BJ, López-Ribot JL. Investigation of multidrug efflux pumps in relation to fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms. *J Antimicrob Chemother* 2002; 49: 973-980.
- Ramage G, Saville S.P, Wickes BL, López-Ribot JL. Inhibition of *Candida albicans* by farnesol, a quorum-sensing molecule. *Appl Environ Microbiol* 2002; 68: 5459-5463.
- Ramage G, Saville SP, Thomas DP, López-Ribot JL. *Candida* Biofilms: an update. *Eukaryotic Cell* 2005; 4: 366-368.
- Romero M, Cantón E, Pemán J, Gobernado M. Antifúngicos inhibidores de la síntesis del glucano. *Rev Esp Quimioterap* 2005; 18: 281-299.
- Schinabeck MK, D'Angelo M, Chandra J. Anidulafungin inhibits *Candida albicans* biofilms *in vitro*. Presented at the 44<sup>th</sup> Annual Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC); Washington, DC, 2004.
- Seidler M, Salvenmoser S, Müller F-MC. *In vitro* effects of micafungin against *Candida* biofilms on polystyrene and central venous catheter sections. *Int J Antimicrob Agents* 2006; 28: 568-573.
- Shuford JA, Rouse MS, Piper KE, Steckelberg JM, Patel R. Evaluation of caspofungin and amphotericin B deoxycholate against *Candida albicans* biofilms in an experimental intravascular catheter infection model. *J Infect Dis* 2006; 194: 710-713.
- Shuford JA, Piper KE, Steckelberg JM, Patel R. *In vitro* biofilm characterization and activity of antifungal agents alone and in combination against sessile cells and planktonic clinical isolates. *Diag Microbiol Infect Dis* 2007; 57: 277-281.
- Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton W. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol* 2002; 56: 187-209.
- Tellier R, Krajden M, Grigoriev A, Campbell I. Innovative endpoint determination system for antifungal susceptibility testing of yeasts. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36: 1619-1625.
- Tortorano AM, Prigitano A, Biraghi E, Viviani MA. The European Confederation of Medical Mycology (ECMN) survey of candidaemia in Italy: *in vitro* susceptibility of 375 *Candida albicans* isolates and biofilm production. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56: 777-779.
- Valentín A, Cantón E, Pemán J, Bosch M, Eraso E, Gobernado M. *In vitro* activity of amphotericin B and anidulafungin against *Candida albicans* biofilms. 17<sup>th</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID) and 25<sup>th</sup> International Congress of Chemotherapy (ICC), Munich, 2007.
- Vehreschild JJ, Kümmerle T, Karthaus M, Cornely OA. Anidulafungin – state of affairs from a clinical perspective. *Mycoses* 2007; 50(Supl. 1): 38-43.