

Actividad de la anidulafungina sobre biopelículas de *Candida*

Javier Pemán¹, Emilia Cantón² y Amparo Valentín²

¹Servicio de Microbiología y ²Unidad de Microbiología Experimental, Centro de Investigación, Hospital Universitario La Fe, Valencia, España

Resumen

Al no disponer de un método estandarizado para el estudio de la actividad in vitro de los antifúngicos sobre biopelículas, la comparación de los resultados es difícil. Los trabajos consultados en esta revisión utilizan la reducción de una sal de tetrazolio (XTT) para medir la actividad de los antifúngicos sobre biopelículas de 24 h de maduración. Hasta ahora, la actividad de anidulafungina sobre biopelículas se ha estudiado en 47 aislamientos de *Candida* spp. (25 *Candida albicans*, 16 *Candida tropicalis*, 5 *Candida dubliniensis* y 1 *Candida parapsilosis*). La media geométrica de la CMI de la anidulafungina sobre biopelículas de *Candida* spp. es de 1,18 µg/ml. Sobre los aislamientos de especies con gran capacidad de formación de biopelículas, la media geométrica de la CMI es 0,325 (*C. albicans*), 2 (*C. parapsilosis*) y 0,5 µg/ml (*C. dubliniensis*). Ninguna de las equinocandinas tiene actividad sobre las biopelículas de *C. tropicalis*. Además, la anidulafungina puede ser apta para el sellado terapéutico de los catéteres ya que es la equinocandina con menor efecto paradójico.

Palabras clave

Actividad in vitro, Anidulafungina, Biopelículas, *Candida*, Equinocandinas

Activity of anidulafungin against *Candida* biofilms

Summary

Currently, no standardized method to study the in vitro activity of antifungal agents on biofilms is available, thus, the comparison among different authors is difficult. The studies discussed in this review use the XTT reduction to measure the activity of antifungals on biofilms of 24 h of maturation. To date, biofilm anidulafungin MICs of 47 isolates of *Candida* spp. (25 *Candida albicans*, 16 *Candida tropicalis*, 5 *Candida dubliniensis* and 1 *Candida parapsilosis*) have been published. The geometric mean MIC of anidulafungin on biofilms of *Candida* spp. is of 1.18 µg/ml. Against isolates of species with great capacity of biofilm formation, the geometric mean MIC is 0.325 (*C. albicans*), 2 (*C. parapsilosis*) and 0.5 µg/ml (*C. dubliniensis*). No echinocandin has activity on *C. tropicalis* biofilms. In addition, anidulafungin can be used for lock therapy of catheters since it is the echinocandin with the least in vitro paradoxical effect.

Key words

In vitro activity, Anidulafungin, Biofilms, *Candida*, Echinocandins

Las biopelículas son comunidades celulares, de una o varias especies de microorganismos, embebidas en una matriz polisacárida altamente hidratada, adheridas sobre superficies biológicas o inertes y comunicadas con el exterior mediante canales de agua [11]. Estas estructuras biológicas son organizaciones muy heterogéneas con diferentes ambientes de pH, concentración de iones, oxígeno, carbono y nitrógeno [36]. La existencia de las biopelículas se conoce desde hace mucho tiempo; de hecho, la mayoría

de los microorganismos se encuentran en la naturaleza viviendo adheridos sobre superficies. Sin embargo, el interés por su estudio es reciente y ha sido motivado por los numerosos problemas que ocasionan, tanto en el campo de la industria como en el de la Medicina.

Gracias al empleo de la microscopía confocal de barrido láser, que permite examinar biopelículas vivas preservando su estructura, se ha comprobado la importancia de los canales de agua que las atraviesan. Estos canales permiten la entrada de oxígeno y nutrientes al interior de las mismas y favorecen la eliminación de los productos de desecho; todo ello induce a pensar en un alto grado de diferenciación celular y en un sistema de comunicación intercelular muy desarrollado [33].

Se estima que aproximadamente un 65% de las infecciones humanas están relacionadas con la formación de biopelículas [25]. Los microorganismos capaces de formar biopelículas sobre dispositivos médicos son muy variados (Tabla 1) y, entre las levaduras patógenas para el hombre, las especies del género *Candida*, sobre todo *Candida albicans* y *Candida parapsilosis*, son las que más frecuentemente forman biopelículas.

Dirección para correspondencia:

Dr. Javier Pemán
Unidad de Micología, Servicio de Microbiología
Hospital Universitario La Fe
Av. Campanar, 21
46009 Valencia, España
Tel.: +34 961973333
E-mail: pemán_jav@gva.es

Muchas candidiasis se encuentran asociadas a la formación de biopelículas sobre catéteres, prótesis dentales o cardíacas y otros dispositivos biomédicos, convirtiéndose en un foco de diseminación de la infección y entorpeciendo las funciones propias de estos dispositivos [11,16]. En la tabla 2 se resume los dispositivos biomédicos y las especies de *Candida* que con más frecuencia forman biopelículas sobre ellos [27].

Características diferenciales de las biopelículas

Las células en las biopelículas (también denominadas sésiles) se diferencian de sus homólogas planctónicas (o en suspensión) por las siguientes características:

1) Existencia de una matriz extracelular, formada por polisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos, altamente hidratada y que confiere a la biopelícula un aspecto gelatinoso [10,33]. La matriz es el soporte principal de la biopelícula y se ha demostrado que su producción aumenta con la edad de la biopelícula [10]. Además, su composición varía en función de los microorganismos que la forman; en *C. albicans* el principal azúcar de la matriz es la glucosa; sin embargo, en *Candida tropicalis* es la hexosamina [2]. Esta diferente composición entre ambas especies puede ser la causa del distinto grado de penetración de los antifúngicos en las biopelículas, resultando más lenta la difusión de

la 5-fluorocitosina y del fluconazol en las biopelículas de *C. tropicalis* [1].

2) Expresión de genes específicos. Diversos estudios han demostrado la expresión de un patrón de genes diferentes en las células que forman parte de las biopelículas. En el caso de *C. albicans* se ha observado que la expresión de los genes que codifican para proteínas implicadas en la adhesión de las células a la superficie del huésped se encuentran regulados de forma diferente [13] y, además, en las biopelículas de *C. albicans* se observa una sobreexpresión de los genes que codifican la síntesis de aminoácidos, nucleótidos y proteínas [6,12]. En las biopelículas maduras, también se ha observado una disminución de los niveles de ergosterol, contribuyendo a la resistencia de los antifúngicos que actúan sobre esta diana [22].

3) Comunicación intercelular (*Quorum-sensing*). En el interior de las biopelículas, las células se comunican mediante la síntesis de productos que difunden entre ellas [33]. Estos productos aumentan conforme se incrementa la densidad celular y, a un determinado umbral, interaccionan con sus receptores y provocan la expresión de genes específicos, como los que expresan virulencia [8]. En células planctónicas y sésiles de *C. albicans* se han identificado dos moléculas *quorum-sensing*, una (tirosol) favorece la formación de la biopelícula en las etapas iniciales y otra (farnesol) evita el desarrollo excesivo de la biopelícula madura [3,23].

Tabla 1. Infecciones asociadas a la formación de biopelículas sobre superficies biológicas

Superficies biológicas	Microorganismos implicados
Endocarditis válvula nativa	<i>Streptococcus (pneumoniae, bovis, sanguis)</i> , <i>Enterococcus</i> , Bacilos Gram (-), <i>Candida</i> spp., <i>Aspergillus</i> spp.
Periodontitis	<i>Streptococcus</i> , Bacilos Gram (-) anaerobios
Otitis media	<i>Streptococcus pneumoniae</i> , estreptococos beta hemolítico grupo A, <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Moraxella catarrhalis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Fibrosis quística	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Burkholderia cepacea</i>
Prostatitis bacteriana	<i>Escherichia coli</i> , <i>Proteus</i> spp., <i>Serratia</i> spp., <i>Klebsiella</i> spp., <i>Staphylococcus coagulasa negativo</i> , Corinebacterias, <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Fascitis necrotizante	Estreptococos beta hemolítico grupo A, Bacilos Gram (-) anaerobios
Cálculos renales de estruvita	<i>Proteus</i> spp., <i>Klebsiella</i> spp., <i>Providencia</i> spp., <i>Pseudomonas</i> spp.
Osteomielitis	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus coagulasa negativo</i>

Tabla 2. Infecciones asociadas a la formación de biopelículas sobre superficies inertes

Superficies inertes	Microorganismos implicados
Válvulas cardíacas protésicas	<i>Staphylococcus coagulasa negativo</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus</i> spp., <i>Enterococcus</i> spp., Bacilos Gram (-), <i>Candida</i> spp., <i>Aspergillus</i> spp.
Catéteres venosos centrales	<i>Staphylococcus</i> spp., <i>Enterococcus</i> spp, Bacilos Gram (-), <i>Candida</i> spp.
Catéteres urinarios	<i>Escherichia coli</i> , <i>Proteus</i> spp., <i>Serratia</i> spp., <i>Klebsiella</i> spp., <i>Staphylococcus coagulasa negativo</i> , Corinebacterias, <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Tubos endotraqueales	Bacilos Gram (-), <i>Candida</i> spp.
Lentes de contacto	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Serratia</i> spp., <i>Proteus</i> spp., <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Candida</i> spp.
Prótesis articulares, mamarias, penianas	<i>Staphylococcus</i> spp., <i>Streptococcus</i> spp.
Dispositivos intrauterinos	<i>Streptococcus</i> spp., <i>Lactobacillus</i> , Corinebacterias, <i>Enterococcus</i> spp., <i>Candida</i> spp.
Sistemas de distribución de agua potable	<i>Cryptosporidium parvum</i> , <i>Giardia lamblia</i> , <i>Aeromonas</i> spp., <i>Legionella pneumophila</i> , micobacterias no tuberculosas, <i>Pseudomonas</i> spp., <i>Staphylococcus</i> spp.

4) Mayor resistencia a las defensas del hospedador y a los antimicrobianos. Los microorganismos formadores de biopelículas también liberan antígenos que estimulan la producción de anticuerpos por parte del hospedador. No obstante, los microorganismos se encuentran protegidos por los polímeros de la matriz y eluden la acción del sistema inmune que, incluso, puede llegar a lesionar los tejidos sobre los que se encuentra la biopelícula [18]. Por su parte, la resistencia de las biopelículas de *Candida* a los antifúngicos es un fenómeno multifactorial en el que intervienen la propia matriz extracelular que actúa como barrera limitando el paso de antifúngicos a su interior, la baja tasa de crecimiento de las células que forman la biopelícula debido a la escasez de nutrientes y oxígeno, la expresión de genes que confieren resistencia o la presencia de células persistentes capaces de escapar a su acción y de volver a reconstruir de nuevo la biopelícula. Además, la resistencia de las biopelículas de *C. albicans* se incrementa conforme se va desarrollando la biopelícula, de tal forma que las biopelículas más viejas son menos sensibles a la acción de los antifúngicos [6,9].

Etapas en la formación de biopelículas

En el proceso de formación de una biopelícula pueden distinguirse varias fases que conviene tener presente a la hora de planificar su tratamiento (Figura 1). En el caso concreto de *C. albicans*, una fase inicial (0-11 h) donde las células levaduriformes se adhieren sobre la superficie y comienzan a formar microcolonias, una fase intermedia (12-30 h) en la cual se comienza a producir la matriz y por último una fase de maduración (32-72 h) en la que la matriz recubre totalmente a las levaduras [6]. A estas tres fases suele seguir otra de disgregación y dispersión de las células de la biopelícula al medio. La disgregación hace que las células vuelvan a su estado de vida planctónico; por lo tanto, la biopelícula se convierte en un foco persistente de infección.

Métodos propuestos para tratar y/o impedir la formación de biopelículas

En la actualidad se han propuesto diferentes sistemas y mecanismos para el tratamiento de las infecciones asociadas a biopelículas. Estas propuestas incluyen materiales que resisten la colonización, nuevos dispositivos recubiertos de antimicrobianos, moléculas inhibitoras del *quorum-sensing* o, incluso, dispositivos capaces de emitir ultrasonidos o corrientes eléctricas para impedir su coloni-

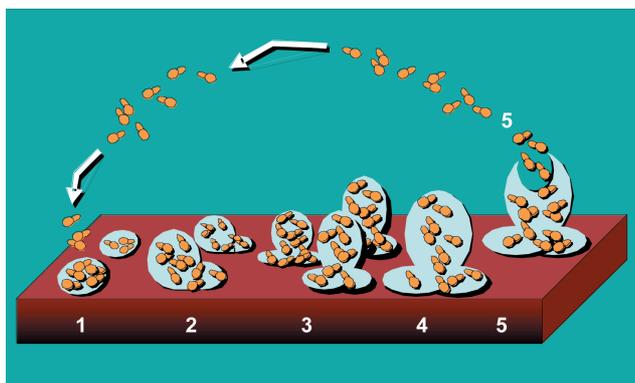


Figura 1. Etapas de desarrollo de una biopelícula: adhesión (1), maduración (2 y 3), disgregación (4) y dispersión (5).

zación o aumentar la disgregación de la biopelícula. Además de estos dispositivos modificados, también se está evaluando la eficacia de nuevos antibióticos o la inmersión de los dispositivos en soluciones microbicidas [20].

Modelo in vitro para el estudio de biopelículas de *Candida*

Para el estudio in vitro de las propiedades de las biopelículas de *Candida* se han empleado varios modelos que han proporcionado información sobre su proceso de desarrollo y también han sido útiles para la determinación in vitro de la eficacia de los antifúngicos sobre las mismas. Sin embargo, todavía no existe un método estandarizado para evaluar la acción de los antifúngicos sobre las biopelículas de *Candida* ya que el método de microdilución M27-A2 utilizado para células planctónicas no es adecuado debido a las diferentes propiedades entre estas y las células en biopelícula.

Uno de los métodos más utilizados para el estudio de la formación de biopelículas y de la actividad antifúngica sobre las mismas es el propuesto por Ramage y cols. [26] en el cual se forman las biopelículas sobre placas de microtitulación de poliestireno con fondo plano. En este método, la formación de la biopelícula y la actividad de los antifúngicos se miden por colorimetría utilizando una sal de tetrazolio (XTT). A la hora de valorar los estudios de actividad antifúngica sobre las biopelículas hay que tener presente los múltiples factores que condicionan la formación de biopelículas de *Candida* spp. así como los propios del método utilizado y madurez de la biopelícula. Entre ellos, el medio de cultivo (composición, pH, temperatura, presencia de iones), la especie de *Candida*, su inóculo, y, por último, las propiedades del sustrato donde se desarrolla la biopelícula.

Actividad de la anidulafungina y otras equinocandinas sobre biopelículas de *Candida*

Los estudios de actividad antifúngica sobre biopelículas publicados hasta la fecha demuestran que el flucanazol y los nuevos triazoles (posaconazol y voriconazol) carecen de actividad sobre las biopelículas de *C. albicans* [7,15]. Las formulaciones lipídicas de la anfotericina B son más activas sobre las biopelículas que la anfotericina B desoxicolato [17]. Por su parte, las equinocandinas, que actúan inhibiendo la síntesis del β -1,3-D-glucano de la pared celular fúngica, han mostrado una actividad prometedora sobre las biopelículas al ser dicho glucano una molécula esencial en la adhesión de *Candida* a las superficies [30,31].

La anidulafungina es una nueva equinocandina activa sobre levaduras, tanto sobre células en suspensión [24] como sobre las células que forman biopelículas [15,34]. En general, las CMI de las equinocandinas sobre biopelículas son mucho más elevadas (entre 10 y 100 veces superiores) que las observadas en sus homologas planctónicas pero se encuentran dentro del intervalo de concentraciones que se alcanzan en suero a las dosis terapéuticas [28].

Actualmente, en el conjunto de trabajos publicados o presentados en diferentes congresos, solo se tiene información de la actividad in vitro de la anidulafungina sobre biopelículas en 47 aislamientos de *Candida* (25 *C. albicans*, 16 *C. tropicalis*, 5 *Candida dubliniensis* y 1 *C. parapsilosis*). En la figura 2 se representa el porcentaje acumulado de biopelículas de 24 h de maduración de 25 *C. albicans* y del total de los 47 aislamientos publicados inhibidas por la

anidulafungina. Según estos trabajos, las CMI de la anidulafungina sobre las biopelículas de *C. albicans*, de 24 h de maduración, oscilan entre 0,03 y >16 $\mu\text{g/ml}$, y la media geométrica (MG) de 0,325 $\mu\text{g/ml}$. Aunque existe variabilidad en los resultados de los diferentes autores, la MG de la CMI obtenida es similar: 0,35 $\mu\text{g/ml}$, en 13 aislamientos de hemocultivo [34], 0,648 $\mu\text{g/ml}$ en ocho aislamientos [35], 0,25 $\mu\text{g/ml}$ obtenida sobre dos aislamientos [15], y 0,03 $\mu\text{g/ml}$ en dos aislamientos [29]. La CMI para la cepa de referencia *C. albicans* ATCC 90028 en biopelículas oscila entre 0,06 y 0,03 $\mu\text{g/ml}$ [29, 34]. Villar y cols. [35] observan que la actividad de la anidulafungina es mayor sobre los aislamientos orales (MG CMI, 0,16 $\mu\text{g/ml}$) de *C. albicans* que sobre los aislamientos de hemocultivo (MG CMI, 1,5 $\mu\text{g/ml}$), a diferencia de lo observado con *C. dubliniensis* donde la actividad de la anidulafungina es mayor sobre los aislamientos de hemocultivo (MG CMI, 0,06 $\mu\text{g/ml}$) que sobre los orales (MG CMI, 2 $\mu\text{g/ml}$).

Sobre *C. parapsilosis*, aunque solo se dispone de información de un único aislamiento, la actividad es muy similar a la obtenida en las células planctónicas (CMI, 2 $\mu\text{g/ml}$) [15]. Finalmente, sobre las biopelículas de *C. tropicalis*, la actividad es muy variable y depende del aislamiento; la CMI oscila entre 0,06 y >16 $\mu\text{g/ml}$, con una MG CMI de 11,2 $\mu\text{g/ml}$ [34]. La actividad de las otras equinocandinas (caspofungina y micafungina) sobre esta especie es del mismo orden, la MG CMI de la caspofungina, obtenida sobre seis aislamientos, es 8,97 $\mu\text{g/ml}$ y la de la micafungina >16 $\mu\text{g/ml}$ (cuatro aislamientos de hemocultivo) [21]. Sobre las biopelículas de *C. albicans*, la MG CMI de la caspofungina es 2,37 $\mu\text{g/ml}$ (cuatro aislamientos), y sobre *C. parapsilosis* 19,1 $\mu\text{g/ml}$ (siete aislamientos), 4 $\mu\text{g/ml}$ para *Candida orthopsilosis* (ocho aislamientos) y 2 $\mu\text{g/ml}$ para *Candida methapsilosis* (cinco aislamientos) [21]. Otros valores descritos de CMI de la caspofungina para *C. albicans* oscilan entre 0,03 y 0,5 $\mu\text{g/ml}$ (cinco aislamientos) y para *C. parapsilosis* 0,06 y 4 $\mu\text{g/ml}$ (tres aislamientos) [4,15,17]. En la tabla 3 y figura 3, se resume la actividad comparada de las tres equinocandinas sobre biopelículas de 24 h de maduración. La actividad antifúngica sobre las biopelículas de 48 h de maduración, es muy inferior (datos no mostrados).

Uno de los métodos más empleados para prevenir la formación de biopelículas es el sellado de los catéteres. Mediante esta técnica se rellena la luz del catéter con una concentración elevada de antifúngico y se sella durante unas horas; de esta forma, se consigue esterilizar el catéter y se evitan los posibles efectos tóxicos de las altas concentraciones. Sin embargo, hasta la llegada de la anidulafungina, las equinocandinas no se recomendaban para el sellado de los catéteres debido a la pérdida de actividad observada a elevadas concentraciones (> 8 $\mu\text{g/ml}$ o a concentraciones entre 8 y 64 veces la CMI), lo que se conoce como efecto paradójico y descrito para la caspofungina tanto en células en suspensión como en biopelícula. La frecuencia con que se presenta este efecto paradójico es de-

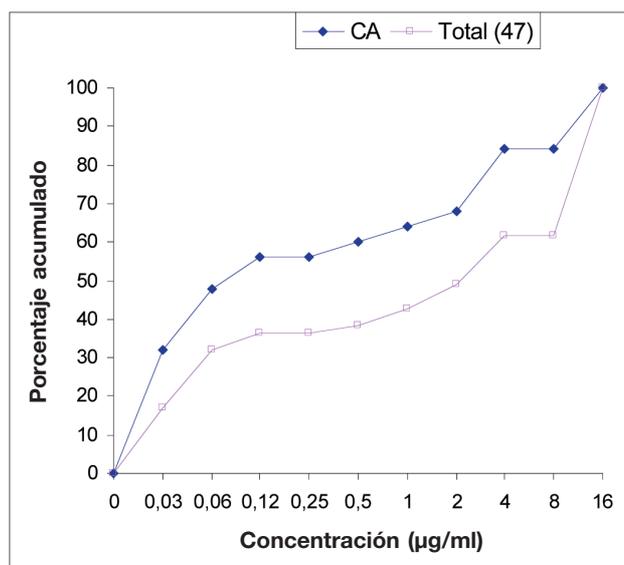


Figura 2. Porcentaje acumulado de biopelículas de *C. albicans* (n = 25) y total (n = 47) inhibidas por la anidulafungina

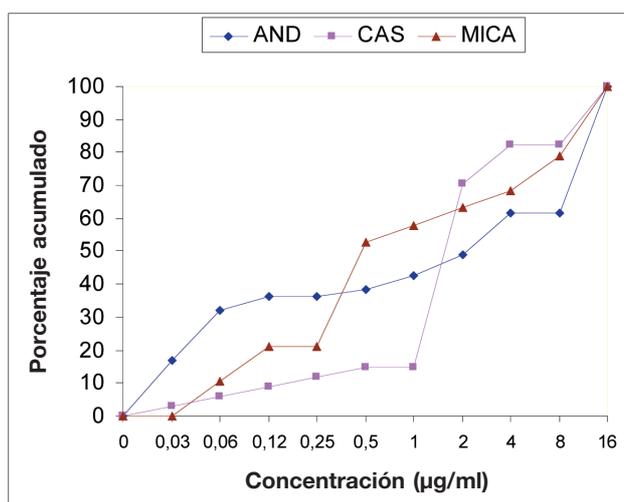


Figura 3. Porcentaje acumulado de la actividad de las equinocandinas sobre biopelículas de *Candida* spp.

pendiente del tipo de equinocandina, la especie fúngica, el aislamiento clínico concreto y el medio utilizado. Se observa con mayor frecuencia en la caspofungina y también ha sido descrito con la micafungina. *C. albicans*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis* son las especies en las cuales se observa este efecto habitualmente [5,21,32]. La anidulafungina es la equinocandina donde este efecto se presenta con menor frecuencia [14]. Long y cols. [19] en un ensayo para

Tabla 3. Resumen de la actividad in vitro (en $\mu\text{g/ml}$) de las equinocandinas sobre biopelículas de 24 h de maduración

Especie	Anidulafungina		Caspofungina		Micafungina	
	intervalo	MG	intervalo	MG	intervalo	MG
<i>Candida albicans</i>	0,03 - >16	0,325	0,03 - 4	2,37	0,06 - 8	0,61
<i>Candida parapsilosis</i>	2	2	2 - 256	5,27	0,12 - 2	0,49
<i>Candida tropicalis</i>	0,06 - >16	11,2	2 - 256	8,97	>16	>16
<i>Candida dubliniensis</i>	0,06 - >4	0,5	ND	ND	ND	ND
Total	0,03 - >16	1,18	0,03 - 256	3,38	0,06 - >16	1,19

determinar la dosis óptima de anidulafungina sobre biopelículas de *C. albicans* formadas en catéteres implantados a conejos, obtienen la esterilización completa del catéter con 2 µg/ml. Además, con 1 y 1,5 µg/ml, obtienen una reducción significativa de las biopelículas con respecto al control.

En resumen, no hay un método estandarizado para el estudio de la actividad de los antifúngicos sobre biopelículas por lo que la comparación de los resultados es difícil. Los trabajos consultados para esta revisión utilizan la reducción del XTT para medir la actividad de los antifúngicos sobre biopelículas de 24 h de maduración. Aunque la mayoría de los estudios se han realizado con pocos aislamientos y es arriesgado sacar conclusiones generales, las

equinocandinas y, particularmente, la anidulafungina han mostrado ser activas sobre las biopelículas de *Candida* (MG CMI, 1,18 µg/ml), si bien su actividad depende de la concentración, de la especie, el aislamiento concreto y la maduración de la biopelícula. La actividad es mayor sobre los aislamientos de especies que poseen gran capacidad de formación de biopelículas como *C. albicans* (MG CMI, 0,325 µg/ml), *C. parapsilosis* (MG CMI, 2 µg/ml) y *C. dubliniensis* (MG CMI, 11,2 µg/ml). En general, las equinocandinas no tienen actividad sobre las biopelículas de *C. tropicalis*. Además, la anidulafungina puede ser apta para el sellado terapéutico de los catéteres ya que es la equinocandina con menor efecto paradójico.

Bibliografía

- Al Fattani MA, Douglas LJ. Penetration of *Candida* biofilms by antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 3291-3297.
- Al Fattani MA, Douglas LJ. Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. *J Med Microbiol* 2006; 55: 999-1008.
- Alem MA, Oteef MD, Flowers TH, Douglas LJ. Production of tyrosol by *Candida albicans* biofilms and its role in quorum sensing and biofilm development. *Eukaryot Cell* 2006; 5: 1770-1779.
- Bachmann SP, Vandewalle K, Ramage G, Patterson TF, Wickes BL, Graybill JR, Lopez-Ribot JL. In vitro activity of caspofungin against *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 3591-3596.
- Canton E, Romero M, Peman J, Valentin A, Gobernado M. Actividad fungicida y efecto paradójico de la caspofungina sobre levaduras. Influencia del medio de cultivo y tiempo de incubación. *Rev Esp Quimioter* 2007; 20: 433-441.
- 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.
- Choi HW, Shin JH, Jung SI, Park KH, Cho D, Kee SJ, Shin MG, Suh SP, Ryang DW. Species-specific differences in the susceptibilities of biofilms formed by *Candida* bloodstream isolates to echinocandin antifungals. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 1520-1523.
- Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999; 284: 1318-1322.
- Donlan RM. Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. *Clin Infect Dis* 2001; 33: 1387-1392.
- Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis* 2002; 8: 881-890.
- Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15: 167-193.
- García-Sánchez S, Aubert S, Iraqui I, Janbon G, Ghigo JM, d'Enfert C. *Candida albicans* biofilms: a developmental state associated with specific and stable gene expression patterns. *Eukaryot Cell* 2004; 3: 536-545.
- Hoyer LL. The ALS gene family of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* 2001; 9: 176-180.
- Jacobsen MD, Whyte JA, Odds FC. *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* respond differently to echinocandin antifungal agents in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 1882-1884.
- Katragkou A, Chatzimoschou A, Simitsopoulou M, Dalakiouridou M, Diza-Mataftsi E, Tsantali C, Roliides E. Differential activities of newer antifungal agents against *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52: 357-360.
- Kojic EM, Darouiche RO. *Candida* infections of medical devices. *Clin Microbiol Rev* 2004; 17: 255-267.
- Kuhn DM, George T, 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.
- Lewis K. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 999-1007.
- Long LA, Kim HW, Cirino A, Sheehan DJ, Ghannoum M. Anidulafungin lock therapy is effective against *C. albicans* biofilms catéter-associated infections in vivo. 3th Trends in Medical Mycology. Torino Abstract P-014. 2007.
- Lynch AS, Robertson GT. Bacterial and fungal biofilm infections. *Annu Rev Med* 2008; 59: 415-428.
- Melo AS, Colombo AL, Arthington-Skaggs BA. Paradoxical growth effect of caspofungin observed on biofilms and planktonic cells of five different *Candida* species. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 3081-3088.
- Mukherjee PK, Chandra J, Kuhn DM, Ghannoum MA. Mechanism of fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms: phase-specific role of efflux pumps and membrane sterols. *Infect Immun* 2003; 71: 4333-4340.
- Nickerson KW, Atkin AL, Hornby JM. Quorum sensing in dimorphic fungi: farnesol and beyond. *Appl Environ Microbiol* 2006; 72: 3805-3813.
- Pfaller MA, Boyken L, Hollis RJ, Kroeger J, Messer SA, Tendolkar S, Diekema DJ. In vitro susceptibility of invasive isolates of *Candida* spp. to anidulafungin, caspofungin, and micafungin: Six years of global surveillance. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 150-156.
- Potera C. Forging a link between biofilms and disease. *Science* 1999; 283: 1837-1839.
- Ramage G, Vande WK, Wickes BL, Lopez-Ribot JL. Standardized method for in vitro antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 2475-2479.
- Ramage G, Vandewalle K, Wickes BL, Lopez-Ribot JL. Characteristics of biofilm formation by *Candida albicans*. *Rev Iberoam Micol* 2001; 18: 163-170.
- Romero M, Canton E, Peman J, Gobernado M. Antifúngicos inhibidores de la síntesis del glucano. *Rev Esp Quimioter* 2005; 18: 281-299.
- Schinabek MK, D'Angelo M, Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum M. Anidulafungin inhibits *C. albicans* biofilms in vitro. 44th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Washington, 2004. Abstract M-1141.
- Seidler M, Salvenmoser S, Muller FM. 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.
- Stevens DA, White TC, Perlin DS, Selitrennikoff CP. Studies of the paradoxical effect of caspofungin at high drug concentrations. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005; 51: 173-178.
- Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton JW. Biofilms as complex differentiated communities. *Ann Rev Microbiol* 2002; 56: 187-209.
- Valentín A, Cantón E, Pemán J, Quindós G. In vitro activity of amphotericin B and anidulafungin against *Candida* spp. biofilms. *Rev Iberoam Micol* 2007; 24: 272-277.
- Villar M, Eraso E, Delgado J, Rodríguez C, Pontón J, Quindós G. In vitro activity of anidulafungin against *C. albicans* and *C. dubliniensis* biofilms developed on polystyrene. *J Chemother* 2007; 19 (Supl. 3): 43.
- Watnick P, Kolter R. Biofilm, city of microbes. *J Bacteriol* 2000; 182: 2675-2679.