



Revisión

Candidiasis asociada a biopelículas

José Luis Del Pozo^{a,b,*} y Emilia Cantón^c

^a Área de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, Laboratorio de Biofilms Microbianos, Clínica Universidad de Navarra, España

^b Instituto de Investigación Sanitaria de Navarra (IdiSNA), Pamplona, España

^c Unidad de Microbiología Experimental, Centro de Investigación La Fe, Valencia, España



INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 14 de noviembre de 2014

Aceptado el 23 de junio de 2015

On-line el 17 de agosto de 2015

Palabras clave:

Candida
Biopelícula
Antifúngicos
Dispositivo biomédico
Detección *quorum*

R E S U M E N

El número de dispositivos biomédicos (catéteres intravasculares, válvulas cardíacas, prótesis articulares, etc.) que se colocan en nuestros hospitales ha aumentado de manera exponencial en los últimos años. Las especies de *Candida* son organismos patógenos que cada vez tienen mayor relevancia en este tipo de infecciones. *Candida* tiene dos formas de desarrollo: planctónica y en biopelícula. Una biopelícula es una comunidad de microorganismos adheridos a una superficie y englobados por una matriz extracelular. Esta forma de desarrollo confiere a los microorganismos una gran resistencia a los agentes antimicrobianos. Esto es la causa de que los tratamientos antibióticos fracasen habitualmente y haya que retirar los dispositivos en la mayor parte de las ocasiones. Los mecanismos de adherencia inespecíficos, los sistemas de adhesina-receptor, y el sistema de comunicación intercelular denominado *quorum sensing* juegan un papel esencial en el desarrollo de las biopelículas de *Candida*. En general, los azoles tienen poca actividad frente a las biopelículas de *Candida*, mientras que las equinocandinas y los polienos muestran una mayor actividad. Es necesario desarrollar nuevas estrategias terapéuticas debido a la elevada morbimortalidad y el gran gasto económico asociado a este tipo de infecciones. La mayor parte de los estudios realizados hasta la fecha se han centrado en las biopelículas bacterianas. El conocimiento del proceso de formación de las biopelículas de *Candida*, así como su composición, es fundamental para poder desarrollar nuevas estrategias preventivas o terapéuticas.

© 2014 Asociación Española de Micología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

Candida biofilm-related infections

A B S T R A C T

The number of biomedical devices (intravascular catheters, heart valves, joint replacements, etc.) that are implanted in our hospitals has increased exponentially in recent years. *Candida* species are pathogens which are becoming more significant in these kinds of infections. *Candida* has two forms of development: planktonic and in biofilms. A biofilm is a community of microorganisms which adhere to a surface and are enclosed by an extracellular matrix. This form of development confers a high resistance to the antimicrobial agents. This is the reason why antibiotic treatments usually fail and biomedical devices may have to be removed in most cases. Unspecific adhesion mechanisms, the adhesion-receptor systems, and an intercellular communication system called quorum sensing play an essential role in the development of *Candida* biofilms. In general, the azoles have poor activity against *Candida* biofilms, while echinocandins and polyenes show a greater activity. New therapeutic strategies need to be developed due to the high morbidity and mortality and high economic costs associated with these infections. Most studies to date have focused on bacterial biofilms. The knowledge of the formation of *Candida* biofilms and their composition is essential to develop new preventive and therapeutic strategies.

© 2014 Asociación Española de Micología. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Keywords:

Candida
Biofilm
Antifungal
Biomedical device
Quorum sensing

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: jdelpozo@unav.es (J.L. Del Pozo).

El número de dispositivos biomédicos (catéteres intravasculares, válvulas cardíacas, prótesis articulares, marcapasos, sondas urinarias, stents ureterales, prótesis intravasculares, etc.) que se colocan en nuestros hospitales ha aumentado de manera exponencial en los últimos años²². Una de las complicaciones que más frecuentemente se asocia a su uso es la infección. El factor clave en la patogenia de estas infecciones es la formación de biopelículas sobre la superficie de los dispositivos. Sin embargo, estas biopelículas pueden formarse también sobre tejidos nativos como por ejemplo una válvula cardíaca, la mucosa del oído medio o los alvéolos pulmonares, de manera que se estima que las biopelículas mono- o polimicrobianas juegan un papel fundamental en alrededor del 70% de las infecciones humanas de carácter subagudo o crónico²². Estas infecciones suponen una importante morbilidad y una no despreciable mortalidad en los pacientes afectados, además de consumir una gran cantidad de recursos médicos y económicos.

Podemos definir de una manera sencilla una biopelícula como una comunidad de microorganismos adheridos a una superficie y englobados por una matriz extracelular autoproducida²⁴. La presencia de estas biopelículas constituye un factor fundamental para la persistencia de la infección, ya que esta forma de desarrollo confiere a los microorganismos una enorme resistencia a los antimicrobianos, sobre todo si lo comparamos con su efecto sobre los mismos microorganismos cuando se desarrollan de forma planctónica¹³. Este hecho es la causa de que los tratamientos antimicrobianos fracasen habitualmente y haya que retirar los biodispositivos en la mayor parte de las ocasiones para conseguir erradicar la infección. Los microorganismos que causan estas infecciones suelen formar parte de la microbiota mucocutánea habitual. Los microorganismos grampositivos (estafilococos, enterococos y estreptococos) son responsables de más de la mitad de los casos de estas infecciones. Estos microorganismos pueden adherirse a la superficie de los biodispositivos durante o tras su colocación por medio de factores inespecíficos (tensión superficial, hidrofobicidad y fuerzas electrostáticas) o mediante adhesinas específicas. Tras la fase de adherencia sigue una fase acumulativa en la que, una vez alcanzada una densidad microbiana suficiente, aumenta el número de señales locales que inducen la activación de genes involucrados en la producción de la biopelícula. Estas biopelículas, compuestas inicialmente por microorganismos en fase de crecimiento exponencial y rodeados por una matriz polimérica, evolucionan posteriormente constituyendo comunidades microbianas complejas con heterogeneidad estructural y funcional. Existe una estrecha interacción entre el microorganismo involucrado (tipo, factores de virulencia), la respuesta inmunológica del huésped (reducción de la capacidad microbicida de los leucocitos o de la capacidad opsonizante del complemento) y el implante (material, superficie, geometría), que influyen sobre el desarrollo de la infección.

La mayor parte de los estudios realizados hasta la fecha se han centrado en biopelículas bacterianas, habiéndose prestado mucha menos atención a las biopelículas fúngicas. Sin embargo hoy en día, y debido a los factores anteriormente mencionados, el número de infecciones fúngicas ha cobrado una mayor relevancia en nuestro medio. El conocimiento del proceso de formación de las biopelículas fúngicas, así como su composición y citoarquitectura, es fundamental para poder desarrollar nuevas estrategias preventivas o terapéuticas que disminuyan la elevada morbimortalidad y el gran gasto económico asociados a este tipo de infecciones.

Biopelículas de *Candida*

La formación y desarrollo de las biopelículas fúngicas depende de muchos factores, unos relacionados con el medio (presencia o ausencia de suero, saliva, orina, etc.) y la superficie en la que se

desarrollan (abiótica o biótica), y otros relacionados con la especie de *Candida* implicada, e incluso con el aislamiento (no todos los aislamientos son capaces de desarrollar biopelículas *in vivo*) y el origen clínico del mismo (infecciones invasivas, cutáneas, ambientales, etc.)^{32,40}. En cuanto a las superficies abióticas sobre las que se desarrollan tienen mucha influencia la composición, rugosidad, carga eléctrica e hidrofobicidad de la misma^{12,32}. Respecto al medio de cultivo cuando se producen *in vitro*, se ha descrito que *Candida albicans* desarrolla más biopelícula en medio RPMI que en medio de orina sintética donde hay menos filamentación⁸⁵. Las biopelículas presentan todas ellas las siguientes características comunes: a) *Matriz extracelular*, formada por polisacáridos, hidratos de carbono, proteínas, ácidos nucleicos, fosfatos y ácido úrico producidos por las células que forman la biopelícula; está altamente hidratada (98% de agua) y confiere a la biopelícula un aspecto viscoso y gelatinoso. La matriz extracelular es una barrera que dificulta la entrada y difusión de los antibióticos. Su composición y arquitectura dependen de la especie de *Candida* y del medio en el que se desarrollan; en las de *C. albicans* el principal azúcar es la glucosa, mientras que en las de *Candida tropicalis* son las hexosaminas. La diferente composición puede influir en el grado y velocidad de penetración de los fármacos antifúngicos en ellas. b) Moléculas *quorum sensing*, sintetizadas por las células que forman la biopelícula y que se difunden de unas a otras como señales de comunicación. La síntesis de estas moléculas aumenta a medida que se incrementa la densidad celular y, a un determinado umbral, interaccionan con sus receptores provocando la expresión de genes específicos. El circuito *quorum sensing* coordina una gran variedad de funciones fisiológicas, interviniendo en la inducción y formación de biopelículas maduras. El tirosol y el farnesol, moléculas *quorum sensing*, actúan de diferente forma; el tirosol favorece la formación de la biopelícula en las etapas iniciales e intermedias del desarrollo, mientras que el farnesol evita el desarrollo excesivo de la misma. Otra característica común en todas las biopelículas es la c) *mayor resistencia a los antimicrobianos* de las células que conforman las biopelículas.

Las biopelículas de *C. albicans* son las más estudiadas y están formadas por una red compleja de células levaduriformes, hifas y pseudohifas interconectadas con una matriz extracelular formada por múltiples biocapas. El mayor componente de la matriz extracelular son los hidratos de carbono (39,6%, de ellos el 32,2% es glucosa, el 5% proteínas, el 3,3% hexosaminas, el 0,5% fósforo y el 0,1% ácido úrico)¹⁹.

Las biopelículas de *Candida parapsilosis* están formadas por agregados de células levaduriformes y pseudohifas, tienen una estructura menos compleja que las de *C. albicans* y son menos densas. La matriz tiene gran cantidad de hidratos de carbono (611 mg/g de biopelícula seca) y relativamente pocas proteínas (50,9 mg/g de biopelícula seca). Hay gran variabilidad según la cepa estudiada^{73,76}.

Las biopelículas de *C. tropicalis* están formadas por hifas y pseudohifas y son más densas que las de *C. parapsilosis*. El mayor componente de la matriz extracelular en esta especie son las hexosaminas (27,4%). Contiene menos proteínas (43 mg/g de biopelícula seca) e hidratos de carbono (24,6 mg/g de biopelícula seca) que las de *C. parapsilosis*^{1,72}.

Candida glabrata, al contrario que *C. parapsilosis* y *C. tropicalis*, no forma filamentos y sus biopelículas están formadas por grupos de células levaduriformes embebidas en la matriz extracelular, con menos biomasa y actividad metabólica que las de *C. albicans*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis*. La matriz extracelular contiene una cantidad elevada de proteínas (227 mg/g de biopelícula seca) e hidratos de carbono (431 mg/g de biopelícula seca)^{2,40,72,73}.

La capacidad de formar biopelículas de las distintas especies de levaduras ha sido estudiada por diversos autores; en general *C. albicans* es la que con mayor frecuencia produce biopelículas, seguida de *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* y *C. glabrata*. De las tres especies del

complejo -psilosis, *C. parapsilosis* es la más productora, seguida de *Candida orthopsilosis* y *Candida metapsilosis*; esta última especie produce biopelículas con poca biomasa⁶⁹. Otros autores sitúan a *C. tropicalis* como la mayor productora de biopelículas⁴⁹. Entre estas especies *C. parapsilosis* es la que presenta mayor variabilidad intraespecie en cuanto a la producción de biopelículas^{56,72}. Cuando se compara de manera general la capacidad de producir biopelículas de los aislamientos de *C. albicans* con los de otras especies del mismo género estos últimos son más productores³⁰. En un estudio reciente, Marcos-Zambrano et al. compararon la biomasa de la biopelícula (medida con cristal violeta) con la actividad metabólica de la misma (medida por reducción del XTT) y concluyeron que hay una considerable variabilidad entre las especies en la producción de la biopelícula y en su actividad metabólica. De acuerdo a otros autores, *C. tropicalis* es la especie que produce biopelículas con más biomasa y *C. glabrata* la que produce las que tienen mayor actividad metabólica⁴⁶.

Infecciones asociadas a biopelículas de *Candida*. Aspectos clínicos

Las infecciones fúngicas representan un problema en aumento en nuestro medio debido al uso cada vez más frecuente de tratamientos antimicrobianos de amplio espectro en los pacientes críticos, al uso de tratamientos antineoplásicos y biológicos cada vez más potentes, y al aumento en el número de maniobras invasivas en el ámbito clínico. *Candida* es un patógeno nosocomial que afecta sobre todo a pacientes críticos, infectados por el VIH, pacientes oncológicos, pacientes trasplantados, pacientes posquirúrgicos y neonatos⁸³. De todo el espectro de infecciones por *Candida* las más graves son las candidiasis invasivas, y es la candidemia el paradigma de todas ellas. De hecho, *Candida* es el cuarto patógeno que más frecuentemente se aísla en hemocultivos en nuestros hospitales^{37,70}. La candidiasis invasiva se asocia con frecuencia a la presencia de biodispositivos médicos que pueden actuar como sustrato para el desarrollo de biopelículas^{14,25}. La mortalidad cruda asociada a las infecciones invasivas por especies de *Candida* puede llegar a ser hasta el 80% según algunos estudios. La candidiasis invasiva se asocia además con un aumento de la estancia media y con un aumento del coste económico que genera la asistencia médica^{3,84,87}.

Hace algunos años *C. albicans* era la especie más frecuentemente implicada en las distintas formas de candidiasis invasiva^{5,50}. Sin embargo, las infecciones por especies distintas han emergido durante las últimas dos décadas produciéndose un aumento de especies como *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *Candida krusei* o *C. tropicalis*^{5,81}. Dos de los factores que más han contribuido a este aumento de otras especies han sido el uso de azoles y el mayor uso de dispositivos intravasculares con el consiguiente aumento de candidemias producidas por especies comensales de la piel como *C. parapsilosis* o *C. glabrata*²⁷. Existen diferencias no solo en la patogenicidad de las diferentes especies de *Candida* sino también en su perfil de resistencia. Por ejemplo, *C. albicans* es más virulenta que *C. krusei*, y sin embargo es mucho más susceptible a los fármacos antifúngicos⁶⁶. *C. glabrata* se consideraba hasta hace no mucho una especie poco virulenta que formaba parte de la microbiota habitual de piel y mucosas; sin embargo, con el uso de inmunosupresores y antibióticos de amplio espectro, las infecciones por esta especie han aumentado de manera exponencial⁸⁰. Del mismo modo que ha ocurrido con las infecciones invasivas, la etiología de las infecciones asociadas a dispositivos biomédicos también ha sufrido este cambio, pero se conoce muy poco sobre la formación de biopelículas por parte de especies de *Candida* no *C. albicans* así como tampoco se conoce demasiado la resistencia a fármacos antifúngicos de estas biopelículas³¹.

El dispositivo que más frecuentemente se asocia con las infecciones asociadas a la presencia de biopelículas fúngicas son los catéteres intravasculares. Estas infecciones pueden presentarse en cualquier momento desde la colocación del catéter. Los microorganismos pueden contaminar los líquidos de infusión o las conexiones del catéter. En los catéteres que se dejan poco tiempo los microorganismos pueden migrar desde la piel del paciente a través de la superficie externa del catéter hasta alcanzar el torrente sanguíneo. En el caso de los pacientes oncológicos neutropénicos, las especies de *Candida* pueden trasladarse al torrente sanguíneo y alcanzar el segmento intravascular del catéter. Del mismo modo, las especies de *Candida* son responsables en otras infecciones asociadas a la presencia de dispositivos biomédicos como prótesis articulares, marcapasos, sondas urinarias, drenajes biliares, etc.

Las infecciones superficiales asociadas a biopelículas de *Candida* son menos graves, pero no menos recalcitrantes. La gingivostomatitis y la periimplantitis son dos de las manifestaciones más frecuentes. En este tipo de infecciones las biopelículas suelen ser polimicrobianas, y la participación de microorganismos del género *Streptococcus* es frecuente. Las bioprótesis fonatorias se colonizan a veces por especies de *Candida*. Las biopelículas formadas en su superficie ocasionan malfunciones de los dispositivos debido a daños de la válvula.

En ocasiones las biopelículas pueden estar implicadas en infecciones no asociadas a la presencia de implantes, como es el caso de la endocarditis sobre válvula nativa. En este caso se pueden formar biopelículas sobre los tejidos dañados. Recientemente se ha demostrado que las biopelículas de *Candida* juegan un papel muy importante en los cuadros de vaginitis candidiásica recurrente.

Mecanismos de resistencia a los fármacos antifúngicos de las biopelículas de *Candida*

La capacidad de *Candida* para formar biopelículas hace que la complejidad en el diagnóstico y en el tratamiento de las infecciones fúngicas asociadas a dispositivos biomédicos haya aumentado de manera exponencial en los últimos años. Las especies de *Candida* que se desarrollan formando biopelículas se caracterizan por su elevada resistencia a los fármacos antifúngicos y a los mecanismos de defensa del hospedador. Esta resistencia es dependiente de la forma de desarrollo en las biopelículas y desaparece cuando estos mismos microorganismos vuelven a desarrollarse en fase planctónica. Esta resistencia es la responsable de que este tipo de infecciones se perpetúen, reaparezcan y ocasionen daños colaterales en los tejidos circundantes. Varios estudios han demostrado que las biopelículas de *Candida* son resistentes a la anfotericina B desoxicolato, al fluconazol, a la flucitosina, al itraconazol y al ketoconazol^{10,14,15,36,44,63,64}. En la misma línea, los nuevos azoles (voriconazol y ravuconazol) han demostrado poca eficacia frente a las biopelículas de *Candida*⁴¹. Por el contrario, y de acuerdo a algunos estudios, las equinocandinas y las formulaciones lipídicas de anfotericina B han mostrado una cierta actividad *in vitro* sobre biopelículas de *Candida*^{8,41,60}.

El uso inadecuado o masivo de los fármacos antifúngicos ha condicionado un aumento en las tasas de resistencia de las especies de *Candida*. Sin embargo, la resistencia que muestran las biopelículas de *Candida* a estos fármacos no se debe a ninguno de los mecanismos clásicos de resistencia antifúngica. Hasta la fecha no se ha descrito un único mecanismo que explique la resistencia asociada a las biopelículas de *Candida*, y se ha propuesto la combinación de varios mecanismos entre los que destacan los siguientes: a) restricción en la penetración del antibiótico a través de la matriz de la biopelícula, b) presencia de enzimas catalizadoras del fármaco antifúngico, c) existencia de sistemas de señalización intercelular (*quorum sensing*) capaces de generar respuestas de estrés,

d) desarrollo de respuestas de estrés a condiciones ambientales hostiles, e) sobreexpresión de genes implicados en mecanismos de resistencia, f) generación de microambientes hostiles a la acción antifúngica en el interior de la biocapa, con baja tensión superficial de oxígeno, capaces de inactivar los fármacos antifúngicos, o g) presencia de una tasa de crecimiento alterada (fase de crecimiento cero, estado estacionario, estado latente o células *persisters*)³. A continuación profundizaremos en los mecanismos más importantes o que más se han estudiado.

(a y b) *Dificultad en la penetración de los fármacos antifúngicos a través de la matriz de la biopelícula.* La matriz de la biopelícula puede actuar como una barrera que dificulte la difusión de los fármacos antifúngicos, de manera que solo las capas más superficiales de la biopelícula estén expuestas al fármaco³³. También puede ocurrir que aunque este pueda penetrar en el espesor de la biopelícula finalmente quede atrapado en los canales de agua que la perforan sin poder alcanzar nunca su célula diana. Además, la sustancia polimérica extracelular es capaz de interactuar con los fármacos antifúngicos inactivándolos o quelándolos. Esta interacción va a depender no solo de la naturaleza química y composición de la matriz sino también de la estructura y propiedades fisicoquímicas del fármaco. La matriz extracelular de *C. albicans* y de *C. tropicalis* es especialmente compleja y está compuesta fundamentalmente por proteínas, hidratos de carbono, hexosaminas, fósforo, ácido úrico, y moléculas de ADN y ARN¹. Uno de los principales hidratos de carbono que la componen es el 1, 3-β-glucano; se ha observado que la exposición de una biopelícula de *C. albicans* a glucanasas desestabiliza las biopelículas, provocando una dispersión de las levaduras¹. Sin embargo, la posibilidad de que la matriz extracelular sea el único responsable de la resistencia es improbable, ya que se ha demostrado que la resistencia de *C. albicans* aparece ya desde las fases iniciales de la formación de la biopelícula cuando todavía no ha comenzado la producción de esta matriz extracelular^{51,62}. Por otra parte, *C. glabrata* no es capaz de producir una gran cantidad de matriz extracelular⁴², sin embargo es capaz de resistir a elevadas concentraciones de fármacos antifúngicos. Al-Fattani et al. observaron en un modelo *in vitro* que la mayor parte de los fármacos antifúngicos eran capaces de difundir a través de una biopelícula de *C. albicans*². La velocidad de difusión a través de las biopelículas de *C. glabrata* y de *C. krusei* de los fármacos ensayados fue mucho más rápida que la velocidad de difusión a través de las biopelículas de *C. parapsilosis* y *C. tropicalis*. En todos los casos, las concentraciones del fármaco en las capas más profundas de la biopelícula fueron muy elevadas. Sin embargo, a pesar de este hecho, los fármacos antifúngicos fueron incapaces de erradicar completamente las biopelículas incluso cuando se aumentó hasta las 24 horas el período de contacto del fármaco con la biopelícula². En este trabajo también se observó que en el caso de las biopelículas mixtas (levaduras y estafilococos) se producía un retraso en la difusión del fármaco antifúngico a través de la biopelícula sugiriendo que el fenómeno de la resistencia puede ser mucho más complicado en un escenario *in vivo*². Martins et al. constataron la importancia del ADN extracelular en el desarrollo y estructura de las biopelículas de *C. albicans*⁴⁸. En un trabajo posterior, este mismo grupo describió que la adición de ADNasa aumentaba la eficacia de la caspofungina, pero no la del fluconazol, frente a biopelículas de *C. albicans*. Parece también que la proteína Hsp90 juega un papel esencial en la resistencia de las biopelículas de *C. albicans* a los azoles. Al bloquear la síntesis de esta proteína se produce una menor cantidad de glucanos, de manera que la cantidad y densidad de la matriz extracelular es menor, lo que facilita la penetración del fluconazol⁶⁸.

(c, d y e) *Quorum sensing y respuestas adaptativas a las señales de estrés del microambiente.* Un mecanismo alternativo de resistencia que se ha propuesto en varios trabajos es la desrepresión o sobreexpresión de genes que codifican enzimas implicadas en

la biosíntesis del colesterol (como la 14-α-desmetilasa, principal diana de los azoles y que codifica el gen *ERG11*). Los principales genes que contribuyen a esta resistencia aumentada en el interior de la biopelícula son aquellos que codifican proteínas transportadoras que expulsan de manera activa diversos fármacos antifúngicos; esta sobreexpresión de bombas de expulsión activa se ha descrito en varios trabajos²⁰. El genoma de *Candida* tiene familias de genes que codifican para proteínas transportadoras dependientes de ATP conocidas como genes *CDR* y *MDR*⁶⁰. Un trabajo reciente ha demostrado que estos genes están sobreexpresados durante las fases de formación de una biopelícula⁶⁰. Estos transportadores tienen la capacidad de unirse a un amplio número de fármacos, incluso aunque no estén estructuralmente relacionados. De hecho, en *C. albicans*, las bombas de expulsión dependientes de *CDR1*, *CDR2* y *MDR1* se encargan principalmente de conseguir un microambiente físico-químico adecuado y poco tóxico para la supervivencia de la levadura. De esta manera la sobreexpresión de estos genes, que originalmente tenían el objetivo de detoxificar el entorno, impacta coincidentemente sobre la sensibilidad antifúngica⁶⁵. La resistencia a los azoles en *C. glabrata* está mediada primariamente por las bombas de expulsión activa *Cdr1*, *Cdr2* y *Snq2*⁶⁸. Resulta interesante que las equinocandinas no parecen verse afectadas por estas bombas de expulsión activa⁵².

(f) *Presencia de un microambiente alterado.* Los microorganismos en el interior de una biopelícula tienden a crecer más lentamente debido a la limitación de nutrientes, especialmente en los estratos más profundos. La velocidad de crecimiento parece ser un factor clave en la modulación de la actividad antifúngica²⁵. Diversos factores como el pH, la temperatura o la tensión de oxígeno son capaces de alterar la citoarquitectura de la biopelícula modificando secundariamente la sensibilidad a los fármacos antifúngicos. En un modelo *in vitro*, la anfotericina B consiguió una mayor reducción en el número de levaduras en el interior de una biopelícula que el ketoconazol, la flucitosina o el fluconazol. Esta reducción se produjo independientemente de la tasa de crecimiento de las levaduras en el interior de la biopelícula⁹. Este hecho indica que la resistencia de las biopelículas de *C. albicans*, al menos a la anfotericina B, depende no solo de la velocidad de crecimiento sino también de otros factores. Es posible además que la resistencia de las biopelículas cambie a lo largo del tiempo según el grado de maduración de la biopelícula. Chandra et al.¹⁴ analizaron la correlación entre el grado de maduración de la biopelícula y su sensibilidad antifúngica. Se calcularon los valores de concentración mínima inhibitoria (CMI) a la anfotericina B, la nistatina, el fluconazol y la clorhexidina de biopelículas jóvenes y maduras de *C. albicans*. Los valores CMI más bajos se obtuvieron en las fases iniciales de desarrollo de la biopelícula. Dichos valores fueron 0,5, 1, 8 y 16 μg/ml frente a la anfotericina B, el fluconazol, la nistatina y la clorhexidina, respectivamente, y fueron aumentando progresivamente a lo largo del proceso de formación de la biopelícula, de manera que a las 72 horas habían aumentado a 8, 128, 32 y 256 μg/ml, respectivamente.

(g) *Desarrollo de células persistentes (persisters).* Algunos trabajos recientes han descrito una subpoblación de levaduras que pueden persistir (*persisters*) en el interior de una biopelícula a pesar de la presencia de anfotericina B y clorhexidina⁴³. En el caso de *C. albicans*, los *persisters* solo se detectaron cuando la levadura se desarrollaba formando una biopelícula y no cuando se desarrollaba de manera planctónica, bien en fase de crecimiento logarítmico o en fase de crecimiento estacionario. La reinoculación de estas levaduras que habían sobrevivido al tratamiento con anfotericina B era capaz de generar una nueva biopelícula con una nueva subpoblación de *persisters*. Este hecho sugiere que los *persisters* de *C. albicans* no son mutantes sino variantes fenotípicas de la cepa salvaje. Falta por conocer de qué manera se inicia la diferenciación de algunas de las levaduras en el interior de la biopelícula hacia el estado *persistenter*. La existencia de estas levaduras en fase de crecimiento latente

es probablemente la principal razón de la tolerancia antifúngica de las biopelículas formadas por las especies de *Candida*⁷⁹.

Actividad antifúngica frente a biopelículas in vitro

La sensibilidad de las biopelículas a los fármacos antifúngicos está directamente relacionada con el grado de maduración, con la actividad metabólica y con la cantidad, composición y arquitectura de la matriz extracelular. La actividad antifúngica es mayor sobre las biopelículas de 24 h que sobre las de 48 h^{10,2,47,57,75,86}.

En general, todos los autores coinciden en que las biopelículas son resistentes a los azoles y sensibles a las equinocandinas y la anfotericina B. También coinciden en que la sensibilidad depende de la especie de *Candida* y del aislamiento^{1,2,86}. Entre las equinocandinas hay diferencias de actividad; Simitsopoulos⁷⁵ ha determinado la actividad de la anidulafungina, la caspofungina y la micafungina sobre las biopelículas de diversas especies de *Candida* aisladas de catéter y concluye que hay diferencias en la actividad según las especies y la equinocandina; la micafungina se muestra como la más activa sobre *C. parapsilosis*, seguida de la anidulafungina y la caspofungina (con una media geométrica [MG] de CMI de 4, 32 y 64 µg/ml, respectivamente); para las biopelículas de *Candida guilliermondii* y *Candida lusitanae* la MG de la CMI es ≥ 32 µg/ml en las tres equinocandinas, mientras que para *C. albicans* y *C. krusei* es ≤ 1 µg/ml. Guembe et al.³⁴ obtienen valores similares con la micafungina para *C. parapsilosis* y *C. albicans*. Pemán et al.⁵⁷ observan que la anidulafungina es más activa sobre las biopelículas de *C. albicans* que la anfotericina B (MG CMI 0,354 vs. 0,686 µg/ml); sin embargo, sobre las de *C. tropicalis* la anfotericina B es más activa (MG CMI 11,28 vs. 0,476 µg/ml). Ramage et al.⁶¹ han determinado la cinética de mortalidad producida por la anfotericina B liposomal, la caspofungina y el voriconazol sobre biopelículas de *C. albicans* y observan que las CMI de caspofungina para las biopelículas de *C. albicans* son más bajas que las de anfotericina B liposomal (0,25 µg/ml vs. 4 µg/ml); sin embargo la acción de la anfotericina B es mucho más rápida (12 h vs. 24 h) aunque produce menos mortalidad que la caspofungina (> 90% en 12 h vs. 99% en 24 h). Mientras la caspofungina y la anfotericina B matan más del 90% de las células de la biopelícula en el plazo de 24 h, el voriconazol solo mata el 18% de ellas en 72 h. Aunque el voriconazol apenas es efectivo sobre las biopelículas se ha descrito que en presencia de 0,25 µg/ml de voriconazol se reduce en un 79% la formación de biopelícula de *C. parapsilosis*, de *C. albicans* (en un 64,5%), *C. tropicalis* (53,3%) y *C. glabrata* (24%). También se reduce si el material ha sido previamente tratado con este fármaco antifúngico⁸⁶.

Actividad antifúngica en modelos experimentales in vivo de infección asociada a biopelículas de especies de *Candida*

Se han desarrollado varios modelos experimentales *in vivo* para el estudio tanto de la patogenicidad como de la efectividad de los tratamientos con fármacos antifúngicos de infecciones causadas por aislamientos productores de biopelículas, utilizando como modelo de infección larvas de *Galleria mellonella*. Fue con este modelo que Cirasola et al.¹⁷ constataron la eficacia de la anidulafungina en el tratamiento de infecciones causadas por aislamientos productores de biopelícula. Otros autores han utilizado modelos de infección en conejos, ratas o ratones. También se han descrito modelos *in vivo* para estudiar la actividad de sustancias que inhiben la formación de biopelículas sobre catéteres que previamente han estado durante 2-24 h en contacto con concentraciones determinadas de la sustancia e implantándolos subcutáneamente, mediante cirugía, en el área interescapular del ratón, introduciendo después de la implantación del catéter un inóculo de la levadura. Transcurrido un tiempo predeterminado, generalmente 7 días, se

sacrifica al ratón y se extrae el catéter para estudiar la biopelícula formada sobre el mismo y compararla con la formada en el catéter sin tratar. De este modo se ha estudiado *in vivo* la actividad del hamamelitanino, el nitrato de cerio o el quitosano de bajo peso molecular sobre biopelículas de *C. albicans* y *C. parapsilosis*^{18,74}.

Nuevas estrategias para el tratamiento de las infecciones asociadas a biopelículas de *Candida*

Dado que el tratamiento de las infecciones asociadas a biopelículas fúngicas con frecuencia fracasa, es necesario definir nuevas estrategias terapéuticas que mejoren el pronóstico de estas infecciones. Estas estrategias podrían consistir en la combinación de varios fármacos antifúngicos con dianas distintas o en la utilización de sustancias sin actividad propiamente antifúngica pero capaces, de alguna manera, de desestabilizar la matriz extracelular o bloquear el sistema de *quorum sensing* en el interior de la biopelícula, y que se comporten como sinérgicas con los diferentes fármacos antifúngicos.

(a) *Combinaciones de fármacos antifúngicos*. Hay pocos estudios que evalúen la actividad de las combinaciones de fármacos antifúngicos sobre biopelículas de *Candida* y, en general, los resultados han sido poco prometedores. Un estudio mostró que una combinación de fármacos antifúngicos era más eficaz a la hora de erradicar una biopelícula de *C. albicans* que un solo fármaco antifúngico⁸². En este trabajo en concreto se observó una disminución en la CMI para el posaconazol cuando este se utilizó en combinación con la anfotericina B. De hecho, se constató una sinergia positiva entre estos dos fármacos antifúngicos. En este mismo trabajo no se observó sinergia alguna entre la anfotericina B y la caspofungina frente a biopelículas de *Candida*⁸². Bachmann et al.⁷ observaron el mismo hallazgo cuando analizaron la combinación de anfotericina B y caspofungina frente a una biopelícula de *C. albicans*. Kaneko et al.³⁹ analizaron la actividad conjunta de la micafungina y el voriconazol frente a *C. albicans*, y aunque esta combinación mostró un efecto sinérgico frente a la forma planctónica de *C. albicans*, fue antagónica frente a biopelículas de esta levadura. En este trabajo se demostró también que la exposición al voriconazol era capaz de inducir la resistencia de *C. albicans* a la micafungina. Shuford et al.⁷¹ estudiaron la eficacia del voriconazol y la caspofungina frente a 30 aislamientos de *C. albicans*; de los ensayos se dedujo que la combinación no mejoraba la actividad de la caspofungina. Alves et al.⁴ estudiaron la actividad de la combinación de diversos fármacos antifúngicos (voriconazol, anfotericina B, fluconazol, flucitosina, caspofungina, itraconazol y ketoconazol) frente a cepas de *C. glabrata* sensibles y resistentes a azoles. Casi todas las combinaciones tuvieron un efecto indiferente, aunque se observó un efecto sinérgico cuando la anfotericina B se combinó con la flucitosina. En este mismo estudio, el ketoconazol mostró un efecto antagónico cuando se combinó con la flucitosina. No todas las combinaciones de fármacos antifúngicos poseen el mismo efecto sobre las biopelículas de *Candida*; el hecho de que una determinada combinación sea sinérgica frente a formas planctónicas de *Candida* no quiere decir que lo vaya a ser frente a biopelículas de la misma cepa.

(b) *Combinaciones de fármacos antifúngicos con antibacterianos*. Vogel demostró que la rifampicina inducía la sobreexpresión de la bomba de eflujo MDR1⁸⁸, lo que explicaría la sinergia entre este antibacteriano y la anfotericina B en un estudio realizado con anterioridad²⁶. La anfotericina B se une a los esteroides de la membrana de la célula fúngica, lo que aumenta la permeabilidad y facilita la entrada de la rifampicina y la consecuente interferencia con la síntesis de ARN. Del mismo modo, la anfotericina B facilita la entrada de otros antibióticos como la doxiciclina, que provoca una interferencia con la síntesis proteica. La eficacia de esta combinación se demostró en un modelo experimental⁶. En dos estudios

se ha analizado la eficacia de la anfotericina B en combinación con moxifloxacino frente a formas planctónicas de *Candida*^{23,89}. En ambos estudios se constató que el moxifloxacino aumentaba la actividad de la anfotericina B. Stergiopoulou et al.⁷⁸ analizaron este fenómeno, que podría ser debido a la capacidad de las quinolonas para inhibir la síntesis del ADN fúngico una vez que la anfotericina B ha actuado sobre la membrana celular. De hecho, las quinolonas podrían ser sinérgicas con las equinocandinas y aumentar la susceptibilidad del enzima glucano sintasa a estos agentes, tal y como se ha sugerido en algún trabajo. Sin embargo, hay muy pocos datos de estas combinaciones frente a biopelículas. En un estudio²⁸, la rifampicina potenció la actividad antimicrobiana de la anfotericina B frente a todas las cepas estudiadas con la excepción de una cepa de *C. glabrata*. En el mismo trabajo la doxiciclina mostró el mismo efecto con la excepción de una cepa de *C. krusei*. La rifampicina redujo la CMI para la anfotericina B en 1-2 diluciones, mientras que la doxiciclina fue capaz de reducirla en 3-4 diluciones. Otro estudio mostró que la combinación de rifampicina o doxiciclina con anfotericina B aumentó la actividad del fármaco antifúngico frente a biopelículas de especies de *Candida* no *C. albicans*²¹.

(c) *Combinaciones de fármacos antifúngicos con otros fármacos.* Algunos estudios recientes han mostrado que la sinvastatina, fármaco que actúa inhibiendo la síntesis del colesterol, es capaz de inhibir la formación de biopelículas por parte de *C. albicans*⁴⁵. Un estudio¹¹ mostró que una solución alcohólica (ETOH) erradicaba de manera rápida y completa una biopelícula de *C. albicans* formada sobre segmentos de catéter de silicona. Stepanovic et al. observaron una disminución del desarrollo de biopelículas de *C. guilliermondii*, *Candida kefyr*, *C. glabrata*, *C. albicans* y *C. parapsilosis* al exponerlas a concentraciones elevadas de ácido acetilsalicílico⁷⁷. Zhou et al.⁹² analizaron la eficacia del ácido acetilsalicílico en combinación con la anfotericina B frente a biopelículas de *C. albicans* y *C. parapsilosis*. En este trabajo se describe una actividad ligeramente sinérgica cuando la combinación se probó frente a microorganismos planctónicos y un efecto fuertemente sinérgico cuando la combinación se utilizó frente a biopelículas. El ácido acetilsalicílico ha demostrado una gran actividad antifúngica, antibacteriana y antiviral debido a su capacidad para producir cambios en el potencial transmembrana y para reducir la producción de polisacárido extracapsular y de prostaglandinas⁹². Otros fármacos como el ibuprofeno y el ambroxol mostraron un efecto sinérgico cuando se combinaron con fluconazol frente a formas planctónicas de *C. albicans*. El ibuprofeno se estudió en combinación con el fluconazol frente a formas planctónicas de *C. albicans*⁶⁷, mientras que el ambroxol se estudió en combinación con el voriconazol frente a biopelículas de *C. parapsilosis*⁵⁸. En este trabajo se observó además que el ambroxol era capaz de reducir la expresión de las bombas de eflujo MDR, lo que aumentaba la acumulación intracelular del azol y, consecuentemente, incrementaba el efecto antifúngico del mismo. Jabra-Rizk et al.³⁸ describieron un efecto sinérgico entre el farnesol y el fluconazol frente a especies de *Candida* resistentes a fluconazol. En este trabajo se revirtió la resistencia al fluconazol al añadir farnesol. Yu et al.⁹⁰ observaron que el farnesol no solamente regulaba la biosíntesis de los esteroides de la membrana, sino que además regulaba la expresión de genes como, por ejemplo, el MDR1. La inhibición del desarrollo de biopelículas por quelantes de cationes divalentes como, por ejemplo, el EDTA se ha descrito no solo en monoterapia³⁵ sino también en las combinaciones de EDTA con el complejo lipídico de anfotericina B⁵⁹. Es posible que las nuevas estrategias de tratamiento pasen en un futuro por alguna de estas sustancias; sin embargo, los datos que tenemos hasta la fecha, aunque prometedores en algunos estudios, son insuficientes.

(d) *Combinaciones de fármacos antifúngicos con inhibidores de quorum sensing.* Como ya se ha mencionado, el sistema de comunicación intercelular denominado *quorum sensing* es un factor clave en la dispersión de las células desde una biopelícula. En *C. albicans*,

el farnesol (uno de los componentes fundamentales de la *quorum sensing*) se identificó inicialmente como una molécula capaz de inhibir la formación de hifas en el interior de biopelículas con una alta densidad celular. Estudios más recientes muestran que el farnesol es capaz de inhibir la formación de biopelículas *in vitro*, aunque el mecanismo exacto por el que lo hace no está claro. La exposición de biopelículas de *C. albicans* al farnesol resulta en la activación de genes implicados en la génesis de la resistencia a antifúngicos, como CaFCR1 y CaPDR16²⁹.

(e) *Combinaciones de fármacos antifúngicos con péptidos catiónicos.* Los péptidos catiónicos han mostrado un efecto sinérgico cuando se usan en combinación con algunos fármacos antifúngicos. Zhai et al. observaron que la polimixina B ejerce una potente actividad antifúngica frente a *C. albicans*, otras especies de *Candida*, *Cryptococcus neoformans* y otros hongos filamentosos cuando se utilizan en combinación con azoles⁹¹.

(f) *Diseño y desarrollo de nuevos biomateriales.* Es imprescindible desarrollar nuevos biomateriales capaces de impedir la adherencia no solo de levaduras sino de cualquier otro microorganismo. La modificación química de los biomateriales permitiría limitar la adhesión de *Candida*¹⁶. Se han propuesto varias estrategias como, por ejemplo, el recubrimiento con nanopartículas metálicas e iones con actividad fungicida, el uso de fármacos embebidos o inmovilizados sobre la superficie de los biomateriales o el uso de polímeros con actividad antifúngica²⁰. El diseño de biomateriales impregnados en fármacos antifúngicos es menos deseable ya que podrían generar la aparición de resistencias.

(g) *Otras estrategias.* Las proteínas de superficie Hwp1⁵³, Als1 y Als3⁵⁴, y la proteína de pared celular Sun41⁵⁵ se han identificado recientemente como proteínas esenciales para la adhesión y expresión de factores de virulencia en *C. albicans*. Estas proteínas o los genes que las codifican podrían ser dianas atractivas como aproximación terapéutica futura.

Conclusiones

Desde que el fenómeno de las biopelículas se describió como una causa importante en la patogenia de ciertas infecciones, la mayor parte de los esfuerzos se han centrado en las biopelículas bacterianas, con escasas referencias en la literatura a las biopelículas fúngicas. Las infecciones asociadas a biopelículas fúngicas han cobrado una gran relevancia en los últimos años. Este tipo de infecciones son frecuentemente refractarias al tratamiento antifúngico, y se necesita en muchas ocasiones un tratamiento quirúrgico que habitualmente implica la retirada del implante, ya sea un catéter intravascular, una prótesis articular o cualquier otro biodispositivo médico. Los mecanismos de resistencia de las biopelículas fúngicas están poco estudiados y, consecuentemente, no conocemos con certeza la eficacia de los diferentes fármacos antifúngicos en el tratamiento de estas infecciones. Necesitamos desarrollar nuevos modelos *in vitro* de infección, además de nuevos modelos experimentales, para poder definir el impacto de nuevas estrategias terapéuticas en estas infecciones. El uso de combinaciones de fármacos antifúngicos, o de combinaciones de estos con otras sustancias podría mejorar el pronóstico de estas infecciones. Desafortunadamente todavía nos queda mucho que aprender sobre la patogenia, diagnóstico y tratamiento de estas infecciones, pero parece claro que es necesario desarrollar nuevas estrategias terapéuticas si queremos mejorar el pronóstico de los pacientes diagnosticados de una infección asociada a la formación de biopelículas.

Financiación

Este trabajo ha sido financiado parcialmente con el proyecto FIS PI 12/02786.

Conflictos de interés

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

- Al-Fattani M A, Douglas LJ. Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. *J Med Microbiol*. 2006; 55:999-1008.
- Al-Fattani M A, Douglas LJ. Penetration of *Candida* biofilms by antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48:3291-7.
- Almirante B, Rodriguez D, Park BJ, Cuenca-Estrella M, Planes AM, Almela M, et al. Epidemiology and predictors of mortality in cases of *Candida* bloodstream infection: results from population-based surveillance, Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. *J Clin Microbiol*. 2005;43:1829-35.
- Alves I A, Bandeira LA, Mario DA, Denardi LB, Neves LV, Santurio JM, et al. Effects of antifungal agents alone and in combination against *Candida glabrata* strains susceptible or resistant to fluconazole. *Mycopathologia*. 2012;174:215-21.
- Apisarnthanarak A, Naknarongkij N, Kiratisin P, Mundy LM. Risk factors and outcomes of *Candida albicans* and non-*albicans Candida* species at a Thai tertiary care center. *Am J Infect Control*. 2009;37:781-2.
- Arroyo J, Medoff G, Kobayashi GS. Therapy of murine aspergillosis with amphotericin B in combination with rifampin of 5-fluorocytosine. *Antimicrob Agents Chemother*. 1977;11:21-5.
- Bachmann S P, Ramage G, VandeWalle K, Patterson TF, Wickes BL, Lopez-Ribot JL. Antifungal combinations against *Candida albicans* biofilms in vitro. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47:3657-9.
- Bachmann S P, VandeWalle K, Ramage G, Patterson TF, Wickes BL, Graybill JR, et al. In vitro activity of caspofungin against *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46:3591-6.
- Baillie G S, Douglas LJ. Effect of growth rate on resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998;42:1900-5.
- Baillie GS, Douglas LJ. Iron-limited biofilms of *Candida albicans* and their susceptibility to amphotericin B. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998;42:2146-9.
- Balestrino D, Souweine B, Charbonnel N, Lautrette A, Aumeran C, Traore O, et al. Eradication of microorganisms embedded in biofilm by an ethanol-based catheter lock solution. *Nephrol Dial Transplant*. 2009;24:3204-9.
- Borghesi E, Sciota R, Biassoni C, Cirasola D, Cappellotti L, Vizzini L, et al. Cell surface hydrophobicity: a predictor of biofilm production in *Candida* isolates. *J Med Microbiol*. 2011;60:689-90.
- Ceri H, Olson ME, Stremick C, Read RR, Morck D, Buret A. The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *J Clin Microbiol*. 1999;37:1771-6.
- 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;183:5385-94.
- Chandra J, Mukherjee PK, Leidich SD, Faddoul FF, Hoyer LL, Douglas LJ, et al. Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic in vitro. *J Dent Res*. 2001;80:903-8.
- Chandra J, Patel JD, Li J, Zhou G, Mukherjee PK, McCormick TS, et al. Modification of surface properties of biomaterials influences the ability of *Candida albicans* to form biofilms. *Appl Environ Microbiol*. 2005;71:8795-801.
- Cirasola D, Sciota R, Vizzini L, Ricucci V, Morace G, Borghi E. Experimental biofilm-related *Candida* infections. *Future Microbiol*. 2013;8:799-805.
- Cobrado L, Silva-Dias A, Azevedo MM, Pina-Vaz C, Rodrigues AG. In vivo antibiofilm effect of cerium, chitosan and hamamelitannin against usual agents of catheter-related bloodstream infections. *J Antimicrob Chemother*. 2013;68:126-30.
- Costa AC, Pereira CA, Freire F, Junqueira JC, Jorge AO. Methods for obtaining reliable and reproducible results in studies of *Candida* biofilms formed in vitro. *Mycoses*. 2013;56:614-22.
- Cuellar-Cruz M, Vega-Gonzalez A, Mendoza-Novelo B, Lopez-Romero E, Ruiz-Baca E, Quintanar-Escorza MA, et al. The effect of biomaterials and antifungals on biofilm formation by *Candida* species: a review. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012;31:2513-27.
- Del Pozo JL, Frances ML, Hernaez S, Serrera A, Alonso M, Rubio MF. Effect of amphotericin B alone or in combination with rifampicin or clarithromycin against *Candida* species biofilms. *Int J Artif Organs*. 2011;34:766-70.
- Del Pozo JL, Patel R. The challenge of treating biofilm-associated bacterial infections. *Clin Pharmacol Ther*. 2007;82:204-9.
- Deren YT, Ozdek S, Kalkan A, Akyurek N, Hasanreisoglu B. Comparison of antifungal efficacies of moxifloxacin, liposomal amphotericin B, and combination treatment in experimental *Candida albicans* endophthalmitis in rabbits. *Can J Microbiol*. 2010;56:1-7.
- Donlan RM. Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. *Clin Infect Dis*. 2001;33:1387-92.
- Douglas LJ. *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol*. 2003;11:30-6.
- Edwards J.E. Jr., Morrison J, Henderson DK, Montgomerie JZ. Combined effect of amphotericin B and rifampin on *Candida* species. *Antimicrob Agents Chemother*. 1980;17:484-7.
- Eggimann P, Garbino J, Pittet D. Management of *Candida* species infections in critically ill patients. *Lancet Infect Dis*. 2003;3:772-85.
- El-Azizi M. Enhancement of the in vitro activity of amphotericin B against the biofilms of non-*albicans Candida* spp. by rifampicin and doxycycline. *J Med Microbiol*. 2007;56:645-9.
- Enjalbert B, Whiteway M. Release from quorum-sensing molecules triggers hyphal formation during *Candida albicans* resumption of growth. *Eukaryot Cell*. 2005;4:1203-10.
- Ferreira AV, Prado CG, Carvalho RR, Dias KS, Dias AL. *Candida albicans* and non-*C. albicans* species: comparison of biofilm production and metabolic activity in biofilms, and putative virulence properties of isolates from hospital environments and infections. *Mycopathologia*. 2013;175:265-72.
- Fidel PL, Jr, Vazquez JA, Sobel JD. *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. *Clin Microbiol Rev*. 1999;12:80-96.
- Frade JP, Arthington-Skaggs BA. Effect of serum and surface characteristics on *Candida albicans* biofilm formation. *Mycoses*. 2011;54:e154-62.
- Gilbert P, Maira-Litran T, McBain AJ, Rickard AH, Whyte FW. The physiology and collective recalcitrance of microbial biofilm communities. *Adv Microb Physiol*. 2002;46:202-56.
- Guembe M, Guinea J, Marcos-Zambrano LJ, Fernandez-Cruz A, Pelaez T, Munoz P, et al. Micafungin at physiological serum concentrations shows antifungal activity against *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58:5581-4.
- Harrison JJ, Turner RJ, Ceri H. A subpopulation of *Candida albicans* and *Candida tropicalis* biofilm cells are highly tolerant to chelating agents. *FEMS Microbiol Lett*. 2007;272:172-81.
- Hawser SP, Douglas LJ. Resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents in vitro. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995;39:2128-31.
- Hobson R P. The global epidemiology of invasive *Candida* infections—is the tide turning? *J Hosp Infect* 2003;55:159-68; quiz 233.
- Jabra-Rizk MA, Shirtliff M, James C, Meiller T. Effect of farnesol on *Candida dubliniensis* biofilm formation and fluconazole resistance. *FEMS Yeast Res*. 2006;6:1063-73.
- Kaneko Y, Ohno H, Fukazawa H, Murakami Y, Imamura Y, Kohno S, et al. Anti-*Candida*-biofilm activity of micafungin is attenuated by voriconazole but restored by pharmacological inhibition of Hsp90-related stress responses. *Med Mycol*. 2010;48:606-12.
- Kuhn DM, Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. *Infect Immun*. 2002;70:878-88.
- 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;46:1773-80.
- Kumamoto CA. *Candida* biofilms. *Curr Opin Microbiol*. 2002;5:608-11.
- LaFleur MD, Kumamoto CA, Lewis K. *Candida albicans* biofilms produce antifungal-tolerant persister cells. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50:3839-46.
- Lewis RE, Kontoyiannis DP, Darouiche RO, Raad II, Prince RA. Antifungal activity of amphotericin B, fluconazole, and voriconazole in an in vitro model of *Candida* catheter-related bloodstream infection. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46:3499-505.
- Liu G, Vellucci VF, Kyc S, Hostetter MK. Simvastatin inhibits *Candida albicans* biofilm in vitro. *Pediatr Res*. 2009;66:600-4.
- Marcos-Zambrano L J, Escribano P, Bouza E, Guinea J. Production of biofilm by *Candida* and non-*Candida* spp. isolates causing fungemia: Comparison of biomass production and metabolic activity and development of cut-off points. *Int J Med Microbiol*;2014;304:1192-8.
- Marcos-Zambrano LJ, Escribano P, Gonzalez del Vecchio M, Bouza E, Guinea J. Micafungin is more active against *Candida albicans* biofilms with high metabolic activity. *J Antimicrob Chemother*. 2014;69:2984-7.
- Martins M, Uppuluri P, Thomas DP, Cleary IA, Henriques M, Lopez-Ribot JL, et al. Presence of extracellular DNA in the *Candida albicans* biofilm matrix and its contribution to biofilms. *Mycopathologia*. 2010;169:323-31.
- Melo A S, Bizerra FC, Freymuller E, Arthington-Skaggs BA, Colombo AL. Biofilm production and evaluation of antifungal susceptibility amongst clinical *Candida* spp. isolates, including strains of the *Candida parapsilosis* complex. *Med Mycol* 2011;49:253-62.
- Moran C, Grussemeyer CA, Spalding JR, Benjamin DK, Jr., Reed SD. *Candida albicans* and non-*albicans* bloodstream infections in adult and pediatric patients: comparison of mortality and costs. *Pediatr Infect Dis J* 2009. 28, 433-5.
- Mukherjee PK, Chandra J. *Candida* biofilm resistance. *Drug Resist Updat*. 2004;7:301-9.
- Niimi K, Maki K, Ikeda F, Holmes AR, Lamping E, Niimi M, et al. Overexpression of *Candida albicans* CDR1, CDR2, or MDR1 does not produce significant changes in echinocandin susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50:1148-55.
- Nobile CJ, Mitchell AP. Genetics and genomics of *Candida albicans* biofilm formation. *Cell Microbiol*. 2006;8:1382-91.
- Nobile CJ, Schneider HA, Nett JE, Sheppard DC, Filler SG, Andes DR, et al. Complementary adhesion function in *C. albicans* biofilm formation. *Curr Biol*. 2008;18:1017-24.
- Norice C T, Smith FJ, Jr., Solis N, Filler SG, Mitchell AP. Requirement for *Candida albicans* Sun41 in biofilm formation and virulence. *Eukaryot Cell* 2007;6:2046-55.
- Panagoda GJ, Ellepola AN, Samaranyake LP. Adhesion of *Candida parapsilosis* to epithelial and acrylic surfaces correlates with cell surface hydrophobicity. *Mycoses*. 2001;44:29-35.

57. Peman J, Canton E, Valentin A. [Activity of anidulafungin against *Candida* biofilms]. Rev Iberoam Micol. 2008;25:124–8.
58. Pulcrano G, Panellis D, de Domenico G, Rossano F, Catania MR. Ambroxol influences voriconazole resistance of *Candida parapsilosis* biofilm. FEMS Yeast Res. 2012;12:430–8.
59. Raad II, Hachem RY, Hanna HA, Fang X, Jiang Y, Dvorak T. Role of ethylene diamine tetra-acetic acid (EDTA) in catheter lock solutions: EDTA enhances the antifungal activity of amphotericin B lipid complex against *Candida* embedded in biofilm. Int J Antimicrob Agents. 2008;32:515–8.
60. Ramage G, Bachmann S, Patterson TF, Wickes BL, Lopez-Ribot JL. Investigation of multidrug efflux pumps in relation to fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms. J Antimicrob Chemother. 2002;49:973–80.
61. Ramage G, Jose A, Sherry L, Lappin DF, Jones B, Williams C. Liposomal amphotericin B displays rapid dose-dependent activity against *Candida albicans* biofilms. Antimicrob Agents Chemother. 2013;57:2369–71.
62. Ramage G, Saville SP, Wickes BL, Lopez-Ribot JL. Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation by farnesol, a quorum-sensing molecule. Appl Environ Microbiol. 2002;68:5459–63.
63. Ramage G, Vande Walle K, Wickes BL, Lopez-Ribot JL. Biofilm formation by *Candida dubliniensis*. J Clin Microbiol. 2001;39:3234–40.
64. Ramage G, Vande Walle K, Wickes BL, Lopez-Ribot JL. Standardized method for in vitro antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. Antimicrob Agents Chemother. 2001;45:2475–9.
65. Ramage G, Vandewalle K, Wickes BL, Lopez-Ribot JL. Characteristics of biofilm formation by *Candida albicans*. Rev Iberoam Micol. 2001;18:163–70.
66. Rex JH, Rinaldi MG, Pfaller MA. Resistance of *Candida* species to fluconazole. Antimicrob Agents Chemother. 1995;39:1–8.
67. Ricardo E, Costa-de-Oliveira S, Dias AS, Guerra J, Rodrigues AG, Pina-Vaz. C. Ibutropfen reverts antifungal resistance on *Candida albicans* showing overexpression of CDR genes. FEMS Yeast Res. 2009;9:618–25.
68. Robbins N, Uppuluri P, Nett J, Rajendran R, Ramage G, Lopez-Ribot JL, et al. Hsp90 governs dispersion and drug resistance of fungal biofilms. PLoS Pathog. 2011;7:e1002257.
69. Ruiz LS, Khouri S, Hahn RC, da Silva EG, de Oliveira VK, Gandra RF, et al. Candidemia by species of the *Candida parapsilosis* complex in children's hospital: prevalence, biofilm production and antifungal susceptibility. Mycopathologia. 2013;175:231–9.
70. Schaberg DR, Culver DH, Gaynes RP. Major trends in the microbial etiology of nosocomial infection. Am J Med. 1991;91:725–55.
71. Shuford JA, Piper KE, Steckelberg JM, Patel R. In vitro biofilm characterization and activity of antifungal agents alone and in combination against sessile and planktonic clinical *Candida albicans* isolates. Diagn Microbiol Infect Dis. 2007;57:277–81.
72. Silva S, Henriques M, Martins A, Oliveira R, Williams D, Azeredo J. Biofilms of non-*Candida albicans* *Candida* species: quantification, structure and matrix composition. Med Mycol. 2009;47:681–9.
73. Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams D, Azeredo J. Silicone colonization by non-*Candida albicans* *Candida* species in the presence of urine. J Med Microbiol. 2010;59:747–54.
74. Silva-Dias A, Palmeira-de-Oliveira A, Miranda IM, Branco J, Coimbra L, Monteiro-Soares M, et al. Anti-biofilm activity of low-molecular weight chitosan hydrogel against *Candida* species. Med Microbiol Immunol. 2014;203:25–33.
75. Simitsopoulou M, Peshkova P, Tasina E, Katragkou A, Kyrpitzis D, Velegriaki A, et al. Species-specific and drug-specific differences in susceptibility of *Candida* biofilms to echinocandins: characterization of less common bloodstream isolates. Antimicrob Agents Chemother. 2013;57:2562–70.
76. Singaravelu K, Gacser A, Nosanchuk JD. Genetic determinants of virulence - *Candida parapsilosis*. Rev Iberoam Micol. 2014;31:16–21.
77. Stepanovic S, Vukovic D, Jesic M, Ranin L. Influence of acetylsalicylic acid (aspirin) on biofilm production by *Candida* species. J Chemother. 2004;16:134–8.
78. Stergiopoulou T, Meletiadis J, Sein T, Papaioannidou P, Tsiouris I, Roilides E, et al. Comparative pharmacodynamic interaction analysis between ciprofloxacin, moxifloxacin and levofloxacin and antifungal agents against *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. J Antimicrob Chemother. 2009;63:343–8.
79. Stewart PS. New ways to stop biofilm infections. Lancet. 2003;361:97.
80. Tan TY, Tan AL, Tee NW, Ng LS, Chee CW. The increased role of non-*albicans* species in candidaemia: results from a 3-year surveillance study. Mycoses. 2010;53:515–21.
81. Thein ZM, Samaranyake YH, Samaranyake LP. In vitro biofilm formation of *Candida albicans* and non-*albicans* *Candida* species under dynamic and anaerobic conditions. Arch Oral Biol. 2007;52:761–7.
82. Tobudic S, Kratzer C, Lassnigg A, Graninger W, Presterl E. In vitro activity of antifungal combinations against *Candida albicans* biofilms. J Antimicrob Chemother. 2010;65:271–4.
83. Tortorano AM, Peman J, Bernhardt H, Klingspor L, Kibbler CC, Faure O, et al. Epidemiology of candidaemia in Europe: results of 28-month European Confederation of Medical Mycology (ECMM) hospital-based surveillance study. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2004;23:317–22.
84. Tumbarello M, Posteraro B, Trecarichi EM, Fiori B, Rossi M, Porta R, et al. Biofilm production by *Candida* species and inadequate antifungal therapy as predictors of mortality for patients with candidemia. J Clin Microbiol. 2007;45:1843–50.
85. Uppuluri P, Dinakaran H, Thomas DP, Chaturvedi AK, Lopez-Ribot JL. Characteristics of *Candida albicans* biofilms grown in a synthetic urine medium. J Clin Microbiol. 2009;47:4078–83.
86. Valentin A, Canton E, Peman J, Quindos G. [In vitro activity of amphotericin B and anidulafungin against *Candida* spp. biofilms]. Rev Iberoam Micol. 2007;24:272–7.
87. Viudes A, Peman J, Canton E, Ubeda P, Lopez-Ribot JL, Gobernado M. Candidemia at a tertiary-care hospital: epidemiology, treatment, clinical outcome and risk factors for death. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2002;21:767–74.
88. Vogel M, Hartmann T, Koberle M, Treiber M, Autenrieth IB, Schumacher UK. Rifampicin induces MDR1 expression in *Candida albicans*. J Antimicrob Chemother. 2008;61:541–7.
89. Yalcin B, Kalkanci A, Gurelik F, Fidan I, Kustimur S, Ozdek S. [In vitro synergistic effect of moxifloxacin and amphotericin B combination against *Candida* strains]. Mikrobiyol Bul. 2010;44:65–70.
90. Yu LH, Wei X, Ma M, Chen XJ, Xu SB. Possible inhibitory molecular mechanism of farnesol on the development of fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilm. Antimicrob Agents Chemother. 2012;56:770–5.
91. Zhai B, Zhou H, Yang L, Zhang J, Jung K, Giam CZ, et al. Polymyxin B, in combination with fluconazole, exerts a potent fungicidal effect. J Antimicrob Chemother. 2010;65:931–8.
92. Zhou Y, Wang G, Li Y, Liu Y, Song Y, Zheng W, et al. In vitro interactions between aspirin and amphotericin B against planktonic cells and biofilm cells of *Candida albicans* and *C. parapsilosis*. Antimicrob Agents Chemother. 2012;56:3250–60.