



Original

Actividad de la anfotericina B y la anidulafungina, solas y combinadas, frente a biopelículas de *Candida tropicalis* formadas sobre Teflon[®] y titanio



Marcelo Ernesto Fernández-Rivero^{a,c,f}, José L. del Pozo^{a,b,c,f}, Amparo Valentín^{d,f}, Victoria Fornes^e, Araceli Molina de Diego^{d,f}, Javier Pemán^{d,f,*} y Emilia Cantón^f

^a Departamento de Microbiología, Universidad de Navarra, Pamplona, España

^b Área de Enfermedades Infecciosas, Clínica Universidad de Navarra, Pamplona, España

^c Laboratorio de Biofilms Microbianos, Clínica Universidad de Navarra, Pamplona, España

^d Servicio de Microbiología Clínica, Hospital Universitario La Fe, Valencia, España

^e Unidad de Bioestadística, Instituto de Investigación Sanitaria La Fe, Valencia, España

^f Grupo de Infección Grave, Instituto de Investigación Sanitaria La Fe, Valencia, España

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 2 de agosto de 2016

Aceptado el 20 de enero de 2017

On-line el 16 de junio de 2017

Palabras clave:

Biopelícula
Candida tropicalis
Anfotericina B
Anidulafungina
Politetrafluoroetileno
Titanio

R E S U M E N

Antecedentes: Las estrategias terapéuticas actuales poseen una limitada eficacia para erradicar biopelículas de *Candida* formadas en la superficie de los dispositivos biomédicos. Pocos estudios han evaluado la eficacia de los antifúngicos sobre biopelículas de *Candida tropicalis*.

Objetivos: Evaluar la actividad de la anfotericina B (AMB) y la anidulafungina (AND), solas y combinadas, sobre biopelículas de *C. tropicalis* desarrolladas en superficies de politetrafluoroetileno (teflón - PTFE) y titanio mediante ensayos de letalidad-tiempo.

Métodos: Los ensayos se realizaron en un CDC Biofilm Reactor sobre biopelículas de 24 h de maduración formadas en discos de PTFE y titanio. Las concentraciones ensayadas fueron 40 mg/l para AMB y 8 mg/l para AND, tanto para su uso por separado como combinadas. Tras 24, 48 y 72 h de exposición a los antifúngicos se determinaron las ufc/cm² mediante agitación vortical y cultivo cuantificado previa sonicación.

Resultados: AMB redujo las células viables adheridas a PTFE y titanio en más de un 99%, y AND lo hizo en un 89,3% en PTFE y 96,8% en titanio. La combinación AMB + AND fue menos activa que la AMB sola tanto en PTFE (descenso en ufc/cm² de 3,09 Log₁₀ vs. 1,08 en la combinación) como en titanio (4,51 vs. 1,53 en la combinación), siendo la interacción indiferente en ambas superficies.

Conclusiones: AMB es más activa que AND sobre biopelículas de *C. tropicalis*. La eficacia sobre las biopelículas es mayor en el titanio. La combinación AMB + AND es menos eficaz que AMB sola en ambas superficies.

© 2017 Asociación Española de Micología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

Activity of amphotericin B and anidulafungin, alone and combined, against *Candida tropicalis* biofilms developed on Teflon[®] and titanium

A B S T R A C T

Keywords:

Biofilm
Candida tropicalis
Amphotericin B
Anidulafungin
Polytetrafluoroethylene
Titanium

Background: Current therapeutic strategies have a limited efficacy against *Candida* biofilms that form on the surfaces of biomedical devices. Few studies have evaluated the activity of antifungal agents against *Candida tropicalis* biofilms.

Objectives: To evaluate the activity of amphotericin B (AMB) and anidulafungin (AND), alone and in combination, against *C. tropicalis* biofilms developed on polytetrafluoroethylene (teflon -PTFE) and titanium surfaces using time-kill assays.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: peman.jav@gva.es (J. Pemán).

Methods: Assays were performed using the CDC Biofilm Reactor equipped with PTFE and titanium disks with *C. tropicalis* biofilms after 24 h of maturation. The concentrations assayed were 40 mg/l for AMB and 8 mg/l for AND, both alone and combined. After 24, 48 and 72 h of exposure to the antifungals, the cfu/cm² was determined by a vortexing-sonication procedure.

Results: AMB reduced biofilm viable cells attached to PTFE and titanium by $\geq 99\%$ and AND by 89.3% on PTFE and 96.8% on titanium. The AMB + AND combination was less active than AMB alone, both on PTFE (decrease of cfu/cm² 3.09 Log₁₀ vs. 1.08 when combined) and titanium (4.51 vs. 1.53 when combined), being the interaction irrelevant on both surfaces.

Conclusions: AMB is more active than AND against *C. tropicalis* biofilms. Yeast killing rates are higher on titanium than on PTFE surfaces. The combination of AMB plus AND is less effective than AMB alone on both surfaces.

© 2017 Asociación Española de Micología. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Las infecciones relacionadas con biopelículas del género *Candida* se han convertido en un importante problema sanitario en los últimos años²⁰, no solo porque las células en el interior de la biopelícula muestran una mayor resistencia a los antimicrobianos sino porque además están protegidas del sistema inmunitario³. Las estrategias terapéuticas actuales poseen una limitada eficacia para erradicar las biopelículas formadas en la superficie de los dispositivos biomédicos colonizados, lo cual obliga en muchas ocasiones a intervenciones quirúrgicas para su retirada y así controlar la infección. Las especies del género *Candida* son capaces de formar biopelículas sobre una gran variedad de biomateriales, desde polímeros plásticos utilizados en catéteres vasculares como el politetrafluoroetileno (conocido como *teflón* - PTFE) hasta materiales metálicos como el titanio, utilizados habitualmente para la fabricación de prótesis osteoarticulares¹⁶.

Aunque *Candida albicans* es la especie más comúnmente relacionada con estas infecciones, *Candida tropicalis* ha emergido como un importante patógeno asociado a pacientes inmunodeprimidos, pacientes ingresados en unidades de críticos y pacientes neutropénicos^{7,10}. En la actualidad, la anfotericina B (AMB) y las equinocandinas han demostrado ser eficaces frente a biopelículas de *C. albicans*^{11,18,26}, y se ha propuesto su utilización para el sellado de catéteres venosos centrales²⁵. Sin embargo, al contrario de lo que ocurre con *C. albicans*, hay pocos estudios que evalúen la eficacia de estos antifúngicos sobre las biopelículas de *C. tropicalis*^{18,26}.

La mayor parte de los trabajos relacionados con biopelículas de *Candida* se han realizado con el análisis de la actividad metabólica de las células en la biopelícula mediante el ensayo de reducción del XTT en placas de poliestireno de 96 pocillos^{19,21}. En la actualidad se dispone de varios modelos *in vitro* para el estudio de las biopelículas microbianas, como los dispositivos de Calgary, el de Robbins o el CDC Biofilm Reactor (CBR). El CBR ha sido estandarizado por la *American Society for Testing Materials* (método E2562 - 12)⁸ y destaca por ser una herramienta eficaz para estudiar la interacción entre el microorganismo y distintos biomateriales con la ventaja de que el fluido está en movimiento. Además, permite evaluar la influencia del biomaterial tanto en la adherencia como en la sensibilidad a los antimicrobianos^{6,17}.

El presente estudio posee un doble propósito: 1) estudiar la cinética de formación de las biopelículas de *C. tropicalis* en dos biomateriales con propiedades fisicoquímicas muy distintas, como el PTFE (hidrófobo) y el titanio (hidrófilo), y 2) evaluar la actividad de AMB y la anidulafungina (AND), solas y combinadas, sobre la biopelícula formada en estos materiales.

Materiales y métodos

CDC Biofilm Reactor y biomateriales

El CBR (modelo CBR 90-1) y los biomateriales fueron suministrados por BioSurface Technologies Corporation (Bozeman, MT, EE.

UU.). El CBR está equipado con ocho portadiscos, incluidos en un recipiente de 1 litro de capacidad. Cada portadisco aloja tres discos de 1,27 cm de diámetro y 0,4 cm de grosor, lo que permite un total de 24 pruebas. Los biomateriales utilizados fueron PTFE (modelo RD 128-PTFE) y titanio comercialmente puro (modelo RD128-Ti).

Antifúngicos

La anfotericina B soluble (ref. A9528) fue suministrada por Sigma-Aldrich (Madrid, España) y disuelta en agua estéril; AND fue suministrada por Pfizer (Madrid, España) en forma de polvo valorado y se disolvió en dimetil sulfoxido. Las concentraciones ensayadas fueron 40 mg/l de AMB y 8 mg/l de AND, las cuales podrían ser potencialmente útiles en una terapia de sellado antifúngico de catéter venoso central.

Caracterización fenotípica del aislamiento

El aislamiento de *C. tropicalis* utilizado fue recuperado de un paciente durante un episodio de candidemia asociada a catéter. La capacidad para formar biopelícula se determinó por el método de tinción con cristal violeta y el ensayo de reducción del XTT^{19,24,26}. La sensibilidad de las células planctónicas a AMB y AND se determinó según el método de microdilución en caldo del CLSI (documento M27-A3)⁵. La CMI frente a AMB se definió como la concentración más baja capaz de inhibir el 100% del crecimiento; la CMI frente a AND se definió como la concentración más baja que produce una inhibición del crecimiento igual o superior al 50%. La sensibilidad de la biopelícula a AMB y AND se determinó en placas de 96 pocillos mediante el ensayo de reducción del XTT previamente descrito²⁶. La CMI de las células en biopelícula (CMIB) se definió como la concentración más baja de antifúngico capaz de reducir la actividad metabólica de la biopelícula $\geq 50\%$ (CMIB₅₀) o $\geq 90\%$ (CMIB₉₀).

Curvas de letalidad

El inóculo se preparó a partir de un cultivo de 24 h en agar glucosado de Sabouraud mediante la suspensión de 1-3 colonias en solución salina estéril y posterior ajuste de la densidad óptica a 2 de la escala de McFarland (10^7 ufc/ml). El CBR, equipado con los discos de PTFE, titanio y con 400 ml de base nitrogenada de levadura (Difco Laboratories, Detroit, MI, EE. UU.) suplementada con glucosa 100 mM (YNBG), se inoculó con 1 ml de la suspensión. Posteriormente se colocó el CBR en un agitador magnético ajustado a 250 rpm. La temperatura se mantuvo durante todo el experimento a $30^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$. Después de 24 h de incubación se retiraron asepticamente tres discos de PTFE y tres discos de titanio para cuantificar el número de células viables en sus superficies previa agitación vorticial y cultivo tras sonicación. Posteriormente se añadió a cada unidad CBR 40 mg/l de AMB y 8 mg/l de AND, solas y combinadas.

A las 24, 48 y 72 h de haber añadido el antifúngico se retiraron los discos de PTFE y titanio para determinar el número de células viables en la biopelícula. Como control se utilizó un CBR en las mismas condiciones de ensayo pero sin antifúngico.

Recuento de células viables adheridas a los discos de PTFE y titanio

Una vez extraído el disco del CBR se lavó con 14 ml de PBS estéril con el fin de eliminar las células no adheridas, se depositó en un tubo con 1 ml de YNBB y se sometió a agitación vorticial durante 1 min a 2.500 rpm, sonicación (modelo Ultrasons-H; JP Selecta, Barcelona, España) durante 5 min a 50 KHz y nueva agitación vorticial durante 1 min a 2.500 rpm. Posteriormente 0,1 ml del caldo obtenido tras la sonicación se diluyó (1:10, 1:100, 1:1000 y 1:10.000) en solución salina estéril y 0,1 ml de cada dilución se sembraron en agar infusión cerebro-corazón (Becton Dickinson, EE. UU.). Las placas se incubaron durante 24 h a 37 °C. Los resultados del cultivo (ufc/ml) se transformaron en Log_{10} ufc/cm² según la ecuación descrita por Goeres et al.⁸ y considerando que la superficie de cada disco es 1,267 cm². Con el fin de minimizar el sesgo los dos biomateriales se ensayaron en el mismo CBR. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

Análisis de los datos

Siguiendo los criterios establecidos para las curvas de letalidad, la interacción entre AMB y AND se clasifica como sinérgica si la disminución en células viables (ufc/cm²) a las 72 h es $\geq 2 \text{ Log}_{10}$ en comparación con el antifúngico más activo, como indiferente si la diferencia en células viables es $< 2 \text{ Log}_{10}$ y $\geq 1 \text{ Log}_{10}$, y antagónica cuando hay un incremento en las células viables $\geq 2 \text{ Log}_{10}$ en comparación con el antifúngico menos activo¹². Se realizó un modelo de regresión lineal con triple interacción (tiempo, biomaterial y antifúngico) para detectar diferencias significativas ($p < 0,05$) en los recuentos de células viables y en las cinéticas de letalidad. Los análisis se realizaron con el programa estadístico R (versión 3.3.2).

Resultados

C. tropicalis fue capaz de formar biopelícula en placas de poliestireno y se clasificó como muy adherente; se utilizaron tanto el procedimiento de tinción con cristal violeta como el ensayo de reducción del XTT. Los valores CMI del aislamiento para AMB y AND fueron de 0,25 mg/l y 0,03 mg/l respectivamente. Las CMIB₅₀ y CMIB₉₀ frente a AMB fueron 4 mg/l y >8 mg/l, respectivamente, y las correspondientes a AND fueron en ambos casos >16 mg/l.

En la [tabla 1](#) se muestra el número de células viables (Log_{10} ufc/cm²) presentes en la biopelícula de *C. tropicalis* formada en las superficies de PTFE y de titanio en presencia y ausencia de los antifúngicos. En el control a las 24 h no se observó un aumento

significativo ($p > 0,05$) de células viables adheridas a la superficie de ambos biomateriales, aunque el número de células adheridas fue ligeramente mayor en PTFE. A las 24 h de la adición de AMB se observó una reducción en el número de ufc/cm² en la biopelícula de 3,09 Log_{10} (99,6% de mortalidad) en PTFE y de 2,84 Log_{10} (99,5% de mortalidad) en titanio. La letalidad en PTFE no aumentó significativamente después de 48 y 72 h de exposición al antifúngico ($p > 0,05$). Por el contrario, en titanio, la mortalidad fue del 100% a las 48 h y se mantuvo hasta el final del experimento.

La exposición a AND sola durante 24 h produjo una disminución de células viables de 0,42 Log_{10} ufc/cm² (36,4% de mortalidad) en PTFE y de 0,51 (55,4% de mortalidad) en titanio; la mortalidad no aumentó significativamente con el tiempo de incubación ([fig. 1](#)). La actividad de AMB fue significativamente mayor ($p < 0,05$) sobre las biopelículas formadas en titanio. AMB fue más activa que AND sobre las biopelículas formada en ambas superficies ($p < 0,05$).

La combinación de AMB y AND alcanzó una reducción de células viables a las 24 h de 1,08 Log_{10} ufc/cm² (89,3% de mortalidad) en PTFE y 1,53 (96,8% de mortalidad) en titanio. En las superficies de titanio se mantuvo constante el número de células viables, mientras que en PTFE se observó un aumento de las mismas a las 24 y 72 h ([tabla 1](#) y [fig. 1](#)). La actividad de AMB se redujo significativamente en presencia de AND ($p < 0,05$) tanto en PTFE (3,09 Log_{10} ufc/cm² vs. 1,08 combinadas) como en titanio (4,51 vs. 1,53 combinadas). No se obtuvieron diferencias significativas entre la actividad de la combinación y la AND sola en ninguno de los dos biomateriales ensayados ($p > 0,05$).

Discusión

Nuestros resultados muestran que AMB es significativamente más eficaz que AND sobre las biopelículas de *C. tropicalis* formadas en la superficie de titanio y PTFE ($p < 0,05$). En la actualidad no parece haber otros estudios que hayan analizado la actividad de estos antifúngicos sobre las biopelículas de *C. tropicalis* formadas en distintos biomateriales, ni usando el CBR como modelo *in vitro* ni realizando curvas de letalidad. Nuestro estudio muestra la escasa actividad de AND sobre las biopelículas desarrolladas en ambos biomateriales, los cuales permanecen colonizados después de 72 h de exposición al fármaco; la resistencia de las biopelículas de *C. tropicalis* a AND ya había sido descrita mediante otras metodologías^{1,18,26}. Por el contrario, AMB es capaz de eliminar más del 99% de las células adheridas a los dos biomateriales, e incluso esterilizar la superficie del titanio después de 48 h de exposición, aunque no consigue erradicar todas las células adheridas al PTFE. Sin embargo, la actividad de la combinación AMB + AND es inferior que la de AMB sola. Al final del experimento (72 h) la interacción, siguiendo los criterios establecidos para las curvas de letalidad, se clasificó como indiferente en ambos biomateriales. En cambio, al analizar gráficamente las curvas obtenidas con respecto al

Tabla 1

Cuantificación de células viables en la biopelícula de *C. tropicalis* desarrollada en PTFE y titanio, después de la exposición a anfotericina B (AMB), anidulafungina (AND) y a una combinación de ambas

Antifúngicos	Biomaterial	Log_{10} ufc/cm ²			
		0 h	24 h	48 h	72 h
Control	PTFE	4,85 ± 0,20	4,91 ± 0,60	4,59 ± 0,19	4,57 ± 0,11
	Titanio	4,24 ± 0,04	4,23 ± 0,26	4,22 ± 0,49	4,48 ± 0,38
AMB 40 mg/l	PTFE	4,71 ± 0,36	1,62 ± 1,08	2,56 ± 0,25	2,27 ± 0,98
	Titanio	4,51 ± 0,36	1,67 ± 0,92	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
AND 8 mg/l	PTFE	4,08 ± 0,54	3,66 ± 0,93	4,08 ± 0,33	3,75 ± 0,16
	Titanio	3,91 ± 0,09	3,40 ± 0,01	3,49 ± 0,24	3,02 ± 0,36
AMB 40 mg/l + AND 8 mg/l	PTFE	3,97 ± 0,22	2,90 ± 0,48	3,54 ± 0,12	3,74 ± 0,00
	Titanio	4,26 ± 0,10	2,73 ± 0,07	2,60 ± 0,18	2,89 ± 0,16

Los datos representan la media ± desviación estándar de tres discos.

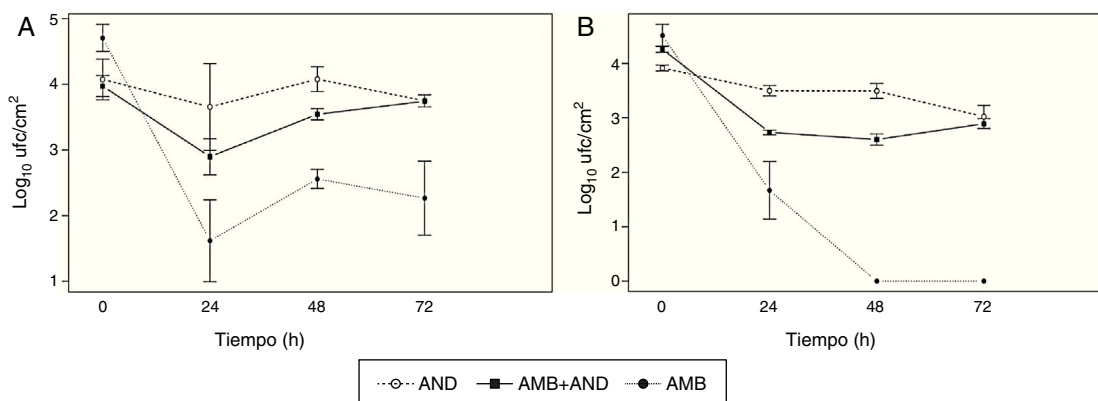


Figura 1. Cinética de letalidad de la anidulafungina (8 mg/l, AND), la anfotericina B (40 mg/l, AMB), y una combinación de ambos antifúngicos a las mismas concentraciones mencionadas frente a la biopelícula de *C. tropicalis* formada sobre PTFE A) y titanio B). Cada punto representa la media $\pm$ desviación estándar de tres discos.

antifúngico más activo (AMB) es posible visualizar una cierta tendencia al antagonismo puesto que la adición de AND conlleva una disminución de la actividad de AMB de 2,01 Log₁₀ en PTFE y de 2,98 Log₁₀ en titanio.

La mayoría de los estudios de sensibilidad de las biopelículas a los antifúngicos se han realizado principalmente con la especie *C. albicans* mediante el ensayo de reducción del XTT, y se dispone de pocos datos sobre la actividad de estos en otras especies de *Candida*^{18,23,26}. Aunque AND ha demostrado ser eficaz frente a las biopelículas de *C. albicans*^{9,18} no ocurre lo mismo con las biopelículas de *C. tropicalis*, ya sea mediante la medida de la actividad metabólica (XTT) o por la determinación de las ufc adheridas al biomaterial (CBR). Estas diferencias entre las dos especies podrían estar relacionadas con la composición de la matriz extracelular, glucosa en *C. albicans* y hexosaminas en *C. tropicalis*, lo cual podría influir en la tasa de difusión del antifúngico al interior de la biopelícula². Por otra parte, las diferencias en la eficacia de los antifúngicos entre ambos biomateriales podrían ser explicadas por las distintas características de la superficie de los biomateriales ensayados. Liu et al.¹⁴ observaron que la adherencia de *Candida* a superficies inertes está mediada por proteínas con dominios hidrofóbicos que podrían facilitar la adhesión a las superficies hidrofóbicas (PTFE) y así explicar las diferencias encontradas entre ambos biomateriales.

Varios autores han estudiado la influencia de la hidrofobicidad del biomaterial en la tasa de crecimiento de la biopelícula^{15,22} y nuestro estudio sugiere que esta propiedad superficial también influye sobre la tasa de mortalidad. Las diferencias en las características superficiales del PTFE (hidrofóbico) y del titanio (hidrofílico) podrían explicar las diferencias de mortalidad de la cepa estudiada encontradas entre los dos biomateriales. Estos resultados refuerzan la hipótesis de que las características fisicoquímicas de las superficies son un factor importante en la evolución de las infecciones relacionadas con las biopelículas de *Candida* y deben tenerse en cuenta en la elección del biomaterial de los dispositivos biomédicos.

Una de las limitaciones de este estudio es la utilización de un solo aislamiento de *C. tropicalis*, si bien se trata de una cepa que ha sido seleccionada previamente por su gran capacidad para formar biopelícula a las 24 h en el CBR. Otra limitación son las concentraciones ensayadas: aunque cercanas a las concentraciones séricas máximas tras la administración de una dosis estándar^{4,13}, no son fisiológicas ya que se mantienen durante un corto periodo de tiempo; no obstante, al ser tan elevadas (>100 veces la CMI), nos dan información para su posible utilización en una terapia de sellado antifúngico de catéter venoso central.

En resumen, nuestros resultados ponen de manifiesto la influencia de los biomateriales en el desarrollo de la biopelícula. AMB es más activa que AND en ambos biomateriales y la mortalidad sobre

la cepa utilizada es mayor sobre superficies de titanio para ambos antifúngicos. La pérdida de actividad de AMB cuando se combina con AND sugiere que esta última podría no ser apropiada para el tratamiento de las infecciones por *C. tropicalis* asociadas a biopelículas.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el Instituto de Salud Carlos III (FIS PI12/02786).

Bibliografía

- Bernhardt H, Knoke M, Bernhardt J. Efficacy of anidulafungin against biofilms of different *Candida* species in long-term trials of continuous flow cultivation. *Mycoses*. 2011;54:e821–7.
- Bizerra FC, Nakamura CV, de Poersch C, Estivalet Svidzinski TI, Borsato Quesada RM, Goldenberg S, et al. Characteristics of biofilm formation by *Candida tropicalis* and antifungal resistance. *FEMS Yeast Res*. 2008;8:442–50.
- 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.
- Cifani C, Costantino S, Massi M, Berrino L. Commercially available lipid formulations of amphotericin B: are they bioequivalent and therapeutically equivalent? *Acta Biomed*. 2012;83:154–63.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference Method for Broth Dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard-Third edition. CLSI document M27-A3.; 2008.
- Coenye T, de Prieck K, Nailis H, Nelis JH. Prevention of *Candida albicans* Biofilm Formation. *Open Mycol J*. 2011;5:9–20.
- Douglas LJ. *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol*. 2003;11:30–6.
- Goeres DM, Loetterle LR, Hamilton MA, Murga R, Kirby DW, Donlan RM. Statistical assessment of a laboratory method for growing biofilms. *Microbiology*. 2005;151:757–62.
- Jacobson MJ, Piper KE, Nguyen G, Steckelberg JM, Patel R. In vitro activity of anidulafungin against *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52:2242–3.
- Kothavade RJ, Kura MM, Valand AG, Panthaki MH. *Candida tropicalis*: its prevalence, pathogenicity and increasing resistance to fluconazole. *J Med Microbiol*. 2010;59:873–80.
- 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.
- Lewis RE, Diekema DJ, Messer SA, Pfaller MA, Klepser ME. Comparison of Etest, checkerboard dilution and time-kill studies for the detection of synergy or antagonism between antifungal agents tested against *Candida* species. *J Antimicrob Chemother*. 2002;49:345–51.
- Liu P, Ruhke M, Meersseman W, Paiva JA, Kantecki M, Damle B. Pharmacokinetics of anidulafungin in critically ill patients with candidemia/invasive candidiasis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57:1672–6.
- Liu Y, Filler SG. *Candida albicans* Als3, a multifunctional adhesin and invasin. *Eukaryot Cell*. 2011;10:168–73.

15. Minagi S, Miyake Y, Inagaki K, Tsuru H, Suganaka H. Hydrophobic interaction in *Candida albicans* and *Candida tropicalis* adherence to various denture base resin materials. *Infect Immun*. 1985;47:11–4.
16. Nobile CJ, Johnson AD. *Candida albicans* biofilms and human disease. *Annu Rev Microbiol*. 2015;69:71–92.
17. Parra-Ruiz J, Vidaillac C, Rose WE, Rybak MJ. Activities of high-dose daptomycin, vancomycin, and moxifloxacin alone or in combination with clarithromycin or rifampin in a novel in vitro model of *Staphylococcus aureus* biofilm. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54:4329–34.
18. Pemán J, Cantón E, Valentín A. Activity of anidulafungin against *Candida* biofilms. *Rev Iberoam Micol*. 2008;25:124–8.
19. Pierce CG, Uppuluri P, Tristan AR, Wormley FL, Mowat E, Ramage G, et al. A simple and reproducible 96-well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. *Nat Protoc*. 2008;3:1494–500.
20. Ramage G, Martinez JP, Lopez-Ribot JL. *Candida* biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. *FEMS Yeast Res*. 2006;6:979–86.
21. 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.
22. Samaranayake YH, Wu PC, Samaranayake LP, So M. Relationship between the cell surface hydrophobicity and adherence of *Candida krusei* and *Candida albicans* to epithelial and denture acrylic surfaces. *APMIS*. 1995;103:707–13.
23. Silva S, Henriques M, Oliveira R, Williams D, Azeredo J. In vitro biofilm activity of non-*Candida albicans* *Candida* species. *Curr Microbiol*. 2010;61:534–40.
24. Stepanović S, Vuković D, Dakić I, Savić B, Švabić-Vlahović M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol Methods*. 2000;40:175–9.
25. Toulet D, Debarre C, Imbert C. Could liposomal amphotericin B (L-AMB) lock solutions be useful to inhibit *Candida* spp. biofilms on silicone biomaterials? *J Antimicrob Chemother*. 2012;67:430–2.
26. Valentín A, Cantón E, Pemán J, Quindós G. In vitro activity of amphotericin B and anidulafungin against *Candida* spp. biofilms. *Rev Iberoam Micol*. 2007;24:272–7.