

Joana Nunes de Moura Pinheiro de Magalhães

**Importância da formação de biofilmes nas infeções associadas a próteses  
ortopédicas**

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de Ciências da Saúde

Porto, 2011



Joana Nunes de Moura Pinheiro de Magalhães

**Importância da formação de biofilmes nas infeções associadas a próteses  
ortopédicas**

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de Ciências da Saúde

Porto, 2011

**Importância da formação de biofilmes nas infecções associadas a próteses  
ortopédicas**

**Orientadora:** Professora Doutora Maria Pia Ferraz

**Autor:** Joana Nunes de Moura Pinheiro de Magalhães

---

Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa  
como parte integrante dos requisitos para obtenção do  
grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

## **Resumo**

Microrganismos imersos num biofilme e protegidos por uma matriz exopolissacarídica têm-se mostrado capazes de se desenvolver e de colonizar muitos dispositivos médicos, incluindo implantes ortopédicos (Bahna et al., 2007).

Com o envelhecimento da população, e conseqüente aumento da esperança média de vida, tem-se verificado um aumento na necessidade de recorrer a dispositivos biomédicos, que têm sido fundamentais para salvar vidas, proporcionando uma melhoria na qualidade de vida de muitos pacientes. Contudo, a presença destes dispositivos aumenta a incidência das infecções bacterianas e fúngicas associadas a biofilmes e dificulta a sua erradicação.

Relativamente aos biomateriais utilizados em ortopedia os mais frequentes são as próteses. No entanto, o seu uso está associado a problemas graves como as infecções de próteses articulares (PJI). Aquando infeção, a solução passa pela remoção cirúrgica do dispositivo biomédico, bem como terapia antimicrobiana prolongada, afetando inevitavelmente a qualidade de vida do paciente.

Uma das causas da dificuldade do tratamento deste tipo de infeções é, então, a formação de um biofilme na prótese. A estrutura do biofilme, assim como certos mecanismos de comunicação entre bactérias e a sua alteração fenotípica, são fatores que dificultam a penetração dos antibióticos, tornando o tratamento ineficaz. Atualmente, as alternativas são pouco eficazes e estão a ser investigadas várias opções clínicas para a resolução deste problema.

Pesquisa sobre biofilmes microbianos está a decorrer em várias frentes, com particular ênfase na elucidação dos genes especificamente expressos pelos organismos associados ao biofilme, na avaliação de diversas estratégias de controlo, incluindo dispositivos médicos tratados com agentes antimicrobianos para prevenir ou remediar a colonização de biofilmes nestes locais e no desenvolvimento de novos métodos para avaliar a eficácia desses tratamentos (Donlan, 2002).

## **Abstract**

Embedded and protected by an exopolysaccharide matrix, biofilm microorganisms have shown to be capable of developing and colonizing several medical devices, including orthopaedic implants. (Bahna et al., 2007).

Considering the aging of the population and the consequent increase of the average lifetime expectancy, it has been noticed an increase on the needs for biomedical devices, which have been of major importance, saving lives and improving the quality of life for many patients. Although, the presence of these devices increases the incidence of bacterial and fungal infections associated with biofilms as well as the difficulty to eradicate them.

For the biomaterial used in orthopedic, prosthetic implants are the most common. However, its use is associated with serious problems such as prosthetic joint infection (PJI). Upon infection, the solution involves the surgical removal of the biomedical device and prolonged antibiotic therapy, inevitably affecting the quality of life of patients.

One of the main causes of the difficulty of treating such infections is the formation of a biofilm on the prosthesis. The structure of the biofilm as well as certain communication mechanisms between bacteria and their phenotypic change, hinder the penetration of antibiotics, making treatment ineffective. Currently, the alternatives are weak and are being investigated more methods in order to solve this clinical problem.

The search on microbial biofilms is going on several fronts, with particular emphasis on the elucidation of genes specifically expressed by biofilm associated organisms, evaluation of various control strategies including medical devices treated with antimicrobial agents to prevent or fight the colonization of biofilms and develop new methods to evaluate the efficacy of these treatments (Donlan, 2002).

## **Agradecimentos**

À Professora Doutora Maria Pia Ferraz agradeço toda a orientação científica, incentivo, disponibilidade e apoio prestado ao longo da realização da escrita e revisão final deste trabalho.

Aos meus amigos, que me acompanharam durante todos estes anos, pela amizade e apoio.

Ao meu namorado, Carlos Jorge, por toda a ajuda e incentivo que me prestou e paciência e amor que sempre me demonstrou durante todos os momentos.

À minha família e irmã, pelo apoio incondicional, carinho e preocupação sempre presentes.

Aos meus queridos pais, que tornaram todo este percurso possível e que tanta confiança depositaram e amor me deram. Muito obrigada por todo o apoio que me proporcionaram!

## **Índice Geral**

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
AGRADECIMENTOS.....	iii
ÍNDICE GERAL.....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vi
ÍNDICE DE TABELAS.....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS.....	viii
<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>I. Introdução ao conceito de biofilme.....</b>	<b>2</b>
1. Definição de biofilme .....	2
2. Composição e estrutura dos biofilmes.....	4
3. Produção/Formação de biofilmes .....	6
4. Fatores que influenciam a formação de biofilmes.....	10
5. Quorum sensing como adjuvante na formação de biofilmes.....	15
6. Espécies microbianas relevantes para a formação de biofilmes.....	16
<b>II. Importância da existência e estudo dos biofilmes .....</b>	<b>20</b>
1. Relação entre a formação de biofilmes e o aparecimento de doenças.....	21
2. Biofilmes e infecções associadas a dispositivos médicos .....	22

<b>III. Mecanismos de resistência e tolerância dos biofilmes ao tratamento antimicrobiano.....</b>	<b>26</b>
<b>IV. Infecções ortopédicas mais relevantes associadas à formação de biofilmes.....</b>	<b>31</b>
1. Infecções de próteses articulares (PJI) .....	33
2. Osteomielite.....	43
<b>V. Novas estratégias usadas no tratamento e prevenção da formação de infecções associadas a biofilmes .....</b>	<b>49</b>
1. Interferência com a sinalização interbacteriana para a formação de biofilmes...	50
2. Abordagens químicas para a eliminação de biofilmes .....	50
3. Abordagens biológicas para erradicação de biofilmes bacterianos .....	51
4. Usos da energia acústica na prevenção de biofilmes.....	51
5. Abordagem de engenharia para evitar artroplastias infetadas .....	52
6. Uso de nanopartículas para prevenção de biofilmes em próteses .....	53
<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>55</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>58</b>

## **Índice de Figuras**

<b>Figura 1</b> – Diagrama de um biofilme .....	2
<b>Figura 2</b> - Estrutura de um biofilme .....	6
<b>Figura 3</b> - Estágios do desenvolvimento de um biofilme .....	7
<b>Figura 4</b> - Imagem de um biofilme de <i>Staphylococcus spp.</i> na superfície interna de um dispositivo médico de longa permanência.....	25
<b>Figura 5</b> - Ilustração dos mecanismos de resistência antimicrobiana por um biofilme maduro .....	28
<b>Figura 6</b> – Biofilme de <i>S. aureus</i> causador de PJI.....	34
<b>Figura 7</b> - Fotografia intraoperatória de uma articulação infetada .....	34
<b>Figura 8</b> - Algoritmo de tratamento de artroplastias infetadas .....	39
<b>Figura 9</b> – Algoritmo de tratamento de artroplastias infetadas .....	42

## **Índice de Tabelas**

<b>Tabela 1</b> – Diferenças entre bactérias planctônicas e biofilmes .....	4
<b>Tabela 2</b> - Variáveis envolvidas na adesão de células, formação e desenvolvimento de biofilmes .....	11
<b>Tabela 3</b> - Lista parcial das infecções humanas que envolvem biofilmes.....	21
<b>Tabela 4</b> – Exemplos de infecções comuns associadas a implantes.....	24
<b>Tabela 5</b> - Critérios para seleção de pacientes para tratamento de ODRI's com salvamento do implante.....	32
<b>Tabela 6</b> - Classificação das infecções associadas a próteses .....	36
<b>Tabela 7</b> - Métodos de tratamento para ATJ infetadas .....	38

### **Lista de abreviaturas e símbolos**

AI – Molécula Autoindutora (“Autoinducer”)

ATJ – Artroplastia total do joelho

CMB – Concentração mínima com poder bactericida

CMI – Concentração mínima inibitória

Cols. – Colaboradores

CoNS – *Staphylococcus* Coagulase-negativo

CSLM - Microscopia Confocal de Varrimento a Laser (“Confocal Scanning Laser Microscopy”)

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

EPS – Substâncias Poliméricas Extracelulares

LPS – Lipopolissacarídeos

MEMS – Microelectromechanical system

MRI – ressonância magnética (“Magnetic Resonance Imaging”)

MRSA – *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina

MSSA - *Staphylococcus aureus* sensíveis à meticilina

ODRI – Infecções relacionadas a dispositivos ortopédicos

OM – Membrana externa (“Outer membrane”)

OM – Osteomielite

OMPs – Proteínas da membrana externa (“Outer membrane proteins”)

O<sub>2</sub> – Oxigênio

PIA – Adesina polissacarídica intercelular (“Polisaccharide intercellular adhesin”)

PJI – Infecções associadas a próteses

PSA – Adesina polissacarídica capsular (“Capsular polisaccharide adhesin”)

QS – Quorum Sensing

QSI – Inibidores quorum sensing

SPION – Nanopartículas de ferro superparamagnético

3D – Tridimensional

$\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> – Óxido de ferro superparamagnético

% - Percentagem

< - Sinal de menor

>- Sinal de maior

## **INTRODUÇÃO**

Este trabalho de revisão bibliográfica surgiu com o intuito de avaliar a importância da formação de biofilmes nas infecções associadas a próteses ortopédicas.

O principal objetivo foi a pesquisa de informação científica para uma melhor compreensão da relação entre a formação de biofilmes e o aparecimento de doenças infecciosas e de todos os mecanismos relacionados com as resistências destas comunidades bacterianas ao tratamento para a sua eliminação. Com a atual tendência para um aumento da incidência destas infecções, é necessário proceder ao desenvolvimento de novas estratégias eficazes que promovam a eliminação e prevenção da formação destes biofilmes.

Inicialmente, pretendeu-se fazer uma revisão bibliográfica dos fundamentos teóricos que constituem a base do tema desta dissertação. Assim sendo, fez-se uma breve abordagem a todos os conceitos relacionados com biofilmes, com o propósito de facilitar a compreensão dos capítulos seguintes, relativos à sua importância nas infecções associadas a próteses ortopédicas.

No primeiro capítulo, definiu-se o conceito de biofilme, fazendo referência à sua composição e estrutura, bem como aos mecanismos envolvidos e fatores que influenciam a sua formação. Numa segunda parte, foi abordado de que forma os biofilmes contribuem para a recorrência de infecções e a importância da sua existência e estudo, nos dias que correm. A terceira parte focou, essencialmente, os mecanismos de resistência e tolerância dos biofilmes ao tratamento antimicrobiano, uma importante preocupação para os profissionais de saúde e de outras áreas, que lidam constantemente com este tipo de infecções que podem causar diversos problemas de saúde pública, ambientais, etc. Nos seguintes capítulos, foram referenciadas as infecções ortopédicas mais relevantes, bem como as novas estratégias usadas no seu tratamento e prevenção.

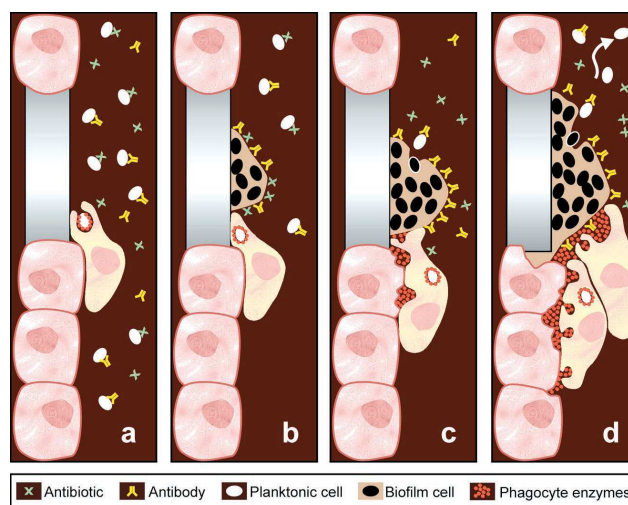
## I. Introdução ao conceito de biofilme

### 1. Definição de biofilme

Durante grande parte da história associada à microbiologia, os microrganismos foram caracterizados apenas como planctônicos, células suspensas que circulam isoladamente, e descritos com base nas suas características de crescimento, em meios de cultura ricos nutricionalmente (Donlan, 2002; Prakash et al., 2003).

No entanto, Antonie van Leeuwenhoek, usando o seu microscópio primitivo (Costerton, 1999) foi capaz de observar, através de análises feitas à sua placa dentária (Behlau and Gilmore, 2008), que os microrganismos apresentavam a capacidade de se agregar e crescer em superfícies expostas (Donlan, 2002), concluindo assim a primeira caracterização de um biofilme. Após esta primeira caracterização, mais estudos foram realizados nesta área com o intuito de compreender melhor a sua constituição e formação (Costerton et al., 1999).

Em suma, após invasão de um novo hospedeiro, as bactérias podem assumir duas formas: a planctônica e a de biofilme quando formam agregados de bactérias (Figura 1) (Pasternak, 2009).



**Figura 1** - Diagrama de um biofilme (adaptado de Costerton et al., 1999)

A definição de biofilme tem evoluído ao longo das últimas duas décadas, consoante os desenvolvimentos das técnicas de visualização microscópica, permitindo a vários autores observar comunidades de bactérias e propor variadas definições (Donlan and Costerton, 2002).

A definição de biofilme é, então, a de uma comunidade microbiana estruturada de derivados sésseis (bactérias, cianobactérias, fungos e protozoários) (Romaní et al., 2008), caracterizado por células que estão irreversivelmente ligadas a um substrato, interface (sólido-líquido) ou umas às outras, que se encontram incorporadas numa matriz composta por substâncias poliméricas extracelulares (EPS) produzidas por elas próprias e que exibem um fenótipo alterado no que diz respeito à taxa de crescimento e transcrição de genes (Donlan and Costerton, 2002).

Os biofilmes constituem um modo de crescimento protegido, que permite a sua sobrevivência num ambiente hostil (Costerton et al., 1999; Hall-Stoodley et al., 2004), e podem consistir em células de várias ou de uma única espécie bacteriana interagindo cooperativamente (Behlau and Gilmore, 2008).

A vida comunitária no interior de um biofilme oferece múltiplas vantagens comparativamente com as bactérias que se encontram em modo de vida livre (Tabela 1) (Behlau and Gilmore, 2008). Estas vantagens advêm do facto dos agregados de bactérias apresentarem um ambiente mais favorável, no que respeita à disponibilidade de nutrientes, interferindo nas suas taxas de crescimento; cooperatividade metabólica e proteção contra fatores externos (Davey & O'Toole, 2000; Prakash et al., 2003).

A proximidade física com outras células bacterianas também favorece interações sinérgicas, mesmo entre membros de espécies diferentes, que englobam: a transferência horizontal de material genético entre microrganismos; a partilha de produtos metabólicos; uma maior tolerância aos agentes antimicrobianos; proteção contra stress ambiental (radiação ultravioleta, mudanças de temperatura, vento, humidade, seca) e proteção contra o sistema imunitário do hospedeiro ou de microrganismos predadores existentes no meio ambiente (Behlau and Gilmore, 2008), tornando os biofilmes bastante difíceis de erradicar (Prakash et al., 2003).

**Tabela 1** - Diferenças entre bactérias planctônicas e biofilmes (adaptado de Behlau and Gilmore, 2008)

<b>Bactérias Planctônicas</b>	<b>Bactérias em biofilmes</b>
Células suspensas e isoladas	Agregados de células; múltiplas células numa interface
Ligeira matriz capsular	Rodeadas por matriz de EPS
Fisiologicamente homogêneas e ativas	Fisiologicamente heterogêneas
Sinalização intracelular, não essencial para divisão celular	Sinalização celular essencial para o crescimento e formação de uma arquitetura organizada
Células ativas fisiologicamente suscetíveis aos antibióticos	10-1000 vezes mais resistentes aos antibióticos
Células individuais reconhecidas e bem orientadas pela resposta imune do hospedeiro	Células inclusas na matriz são inacessíveis para a resposta do hospedeiro e resistentes aos agentes antimicrobianos

## **2. Composição e estrutura dos biofilmes**

O desenvolvimento e aplicação de técnicas de microscopia avançada, como a microscopia confocal de varrimento a laser (CSLM), forneceram importantes revelações sobre a organização estrutural e função das comunidades bacterianas presentes num biofilme (Donlan and Costerton, 2002).

A primeira observação direta envolvendo biofilmes microbianos revelou que essas populações aderentes, geralmente continham muito mais células do que a população planctônica do ecossistema em questão (Costerton et al., 1994).

Usando estas técnicas, os biofilmes têm-se revelado estruturas dinâmicas e altamente organizadas, compostas por unidades estruturais e funcionais básicas (microcolônias) de uma ou várias espécies (Costerton, 1995; Costerton, 1999), que podem variar desde uma única camada, a uma espessa comunidade de células rodeadas por uma matriz heterogênea de EPS (Brady et al., 2008; Hall-Stoodley et al., 2004).

Os biofilmes são majoritariamente água. Da sua constituição, 15% correspondem a bactérias e 85% em volume a substâncias poliméricas extracelulares (EPS), que

constituem a matriz (Behlau and Gilmore, 2008; Kokare et al., 2009). As substâncias poliméricas extracelulares são altamente hidratadas, pois podem incorporar grandes quantidades de água na sua estrutura através de ligações de hidrogénio (Prakash et al., 2003) e consistem em 97% de água por massa; polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos e, em menor quantidade, lípidos, fosfolípidos e outros polímeros. Para além disso, podem encontrar-se presentes vacúolos bacterianos, flagelos, fagos, pili, material da matriz do hospedeiro e restos de células lisadas (Behlau and Gilmore, 2008; Simões et al., 2010).

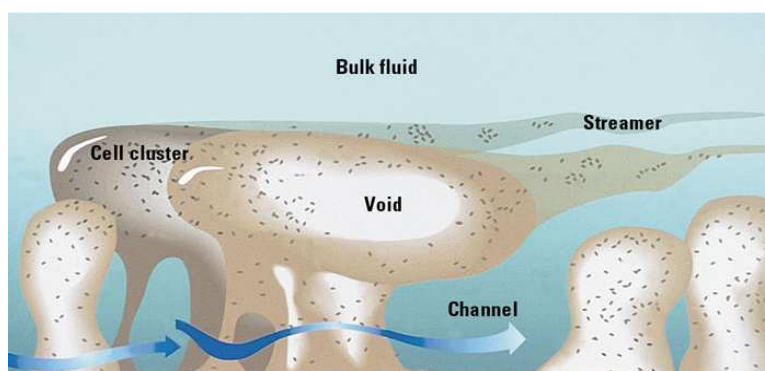
Análises estruturais mostraram que estes biofilmes espessos possuem uma arquitetura complexa na qual podem existir microcolónias em pilares distintos ou estruturas em forma de cogumelo, através do qual se constitui uma rede intrínseca de canais altamente permeáveis, que permitem o acesso aos nutrientes e oxigénio do meio ambiente, mesmo nas áreas mais profundas do biofilme (Figura 2) (Brady et al., 2008; Hall-Stoodley et al., 2004).

A troca de nutrientes é então facilitada por esta arquitetura e permite que as comunidades do biofilme desenvolvam uma complexidade e espessura considerável, mantendo as células individuais num estado nutricional ótimo em diversas zonas dentro do biofilme (Stoodley et al., 2002).

As bactérias que se encontram próximo do fluído que rodeia o biofilme apresentam maior acesso aos nutrientes e oxigénio, comparando com aquelas que se encontram no centro da matriz ou junto ao substrato (Behlau and Gilmore, 2008). DeBeer et al. (*cit. in* Stoodley et al., 2002) demonstraram que os canais em torno dos aglomerados de células poderiam aumentar o fornecimento de oxigénio e outros nutrientes para as bactérias no interior do biofilme (Stoodley et al., 2002).

A matriz de EPS é um parâmetro crucial para a arquitetura e estabilidade estrutural do biofilme, proporcionando um refúgio para a comunidade microbiana contra a tensão de corte, protegendo-a também contra a dessecação (Romaní et al., 2008). A quantidade de EPS produzida por diferentes organismos pode variar e tende a aumentar com a maturidade do biofilme (Kokare et al., 2009).

Devido ao facto da estrutura de um biofilme ser influenciada por diversos parâmetros como as propriedades da superfície e interface (hidrofobicidade, rugosidade, propriedades eletroquímicas), hidrodinâmica (tensão de corte, atrito), disponibilidade de nutrientes (concentração, propriedades antimicrobianas, taxa de crescimento), diversidade ecológica da comunidade microbiana (sinalização celular, motilidade) e produção de EPS (Stoodley et al., 2002), cada biofilme é considerado único (Stoodley et al., 1997).



**Figura 2** - Estrutura de um biofilme (adaptado de <<http://ehp.niehs.nih.gov/realfiles/docs/1998/106-12/innovations.html>>)

### 3. Produção/Formação de biofilmes

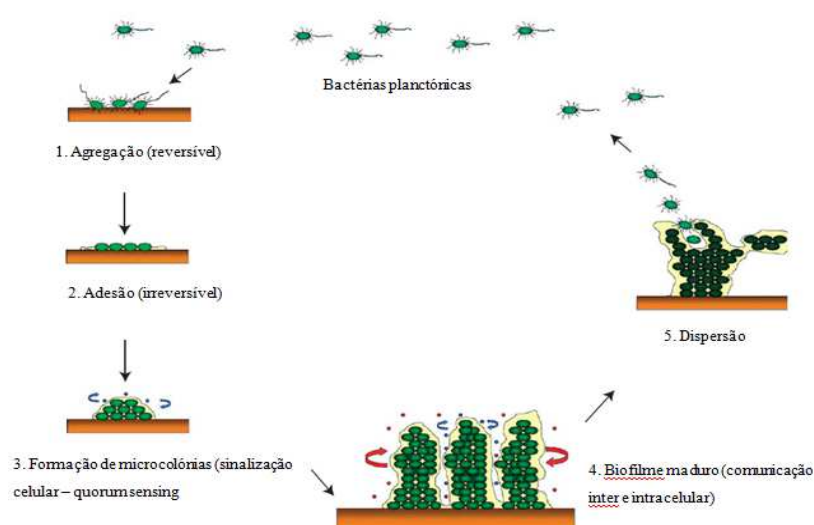
A formação de uma estrutura 3D de biofilme com comunidades bacterianas funcionalmente heterogêneas é um processo dinâmico. Trata-se de uma série coordenada de eventos moleculares (fixação microbiana à superfície, produção de matriz, proliferação celular com formação de microcolônias, maturação do biofilme e desprendimento da superfície), que são parcialmente controlados por *quorum sensing*, um mecanismo de comunicação interbacteriano dependente da densidade populacional (Fux et al., 2003).

Após formação do biofilme e da matriz exopolissacarídica secretada pelas células bacterianas, origina-se uma estrutura altamente viscoelástica. Quando formados em ambientes de baixa tensão de corte, os biofilmes apresentam uma baixa resistência à tração e quebram com facilidade. Por outro lado, se são formados em ambientes de

elevada tensão de corte, apresentam-se bastante fortes e resistentes a quebras mecânicas (Donlan and Costerton, 2002).

A formação de um biofilme pode ocorrer, pelo menos, por três mecanismos: 1) pela redistribuição de células através da motilidade da superfície à qual estão aderidas; 2) pela divisão binária das células aderidas, à medida que as células se dividem, as células filhas espalham-se, a partir da superfície à qual estão aderidas, para formar agrupamentos de células; 3) pelo recrutamento de células para o desenvolvimento do biofilme. A contribuição de cada um destes mecanismos dependerá do tipo de organismos envolvidos, da natureza da superfície que será colonizada e das condições físico-químicas do ambiente (Stoodley et al., 2002).

O primeiro estágio da formação de um biofilme envolve a associação reversível de células e o começo da sua adesão à superfície. Por sua vez, o segundo estágio envolve o início da produção da matriz polissacarídica e a adesão completa/irreversível das células à superfície. Posteriormente, ocorre a divisão da célula bacteriana e agregação de células, umas às outras, em microcolônias, formando o biofilme maduro. A maturação da arquitetura do biofilme ocorre no quarto estágio, com a formação de canais de água dividindo as comunidades bacterianas. Por fim, o último estágio envolve a dispersão de células individuais do biofilme (Figura 3) (Behlau and Gilmore, 2008).



**Figura 3** - Estágios do desenvolvimento de um biofilme  
(adaptado de Behlau and Gilmore, 2008)

i. Mecanismos de agregação e adesão bacteriana e colonização de superfícies

A formação de biofilmes começa, necessariamente, pela adesão de um pequeno número de células bacterianas planctônicas a uma superfície (Costerton, 1999). Nesta fase, as células aderentes ainda não se encontram “comprometidas” ao processo de diferenciação, levando à formação do biofilme e podendo, muitas delas, deixar a superfície e retomar à sua forma de vida livre (Stoodley et al., 2002).

Durante esta fase de adesão reversível, as bactérias apresentam vários comportamentos específicos de cada espécie, que incluem rotação (*rolling*), deslizamento (*gliding*), formação de agregados, entre outros, antes de se estabelecerem num local e começarem a iniciar o processo de adesão irreversível à superfície (Behlau and Gilmore, 2008; Costerton, 1999; Stoodley et al., 2002).

Esta mudança na adesão bacteriana, de forma reversível para forma irreversível, foi observada já em 1943 por Zobel, e tem sido caracterizada por Characklis como a passagem de uma interação fraca entre a célula e o substrato, para uma ligação permanente, frequentemente mediada pela presença de polímeros extracelulares (Stoodley et al., 2002).

A transição entre estes dois estados de adesão é mediada por pili do tipo IV (porções celulares das bactérias que lhes permite a locomoção (*twitching motility*), que retraem e estendem, impulsionando a bactéria sobre toda a superfície (Stoodley et al., 2002). Este modo de locomoção parece estar envolvido na formação de microcolônias, onde se pensa que a interação entre as diversas bactérias, numa superfície para formar grupos de células, ajuda a fortalecer o grau de adesão à superfície (Stoodley et al., 2002).

ii. Maturação do biofilme

Depois de uma bactéria aderir à superfície inerte ou ao tecido vivo, a associação torna-se estável para a formação de microcolônias. As bactérias começam a multiplicar-se dentro da matriz exopolissacarídica, emitindo sinais químicos que lhes permite intercomunicar com todas as células bacterianas (Prakash et al., 2003).

À medida que os biofilmes maturam, desenvolvem a sua arquitetura básica, com formação de canais de água, e muitas células alteram os seus processos fisiológicos em resposta às condições nos seus nichos. As microcolónias individuais podem desprender-se da superfície ou podem originar bactérias que reverterem ao estado planctónico (*planktonic revertants*) que nadam ou flutuam para longe da superfície, deixando remanescentes de microcolónias ocas ou espaços vazios que se tornam parte dos canais de água (Stoodley et al., 2002). Além disso, todas as microcolónias podem desprender-se do biofilme sem que haja alguma perturbação evidente, através de processos não controlados, pelo que, a determinada altura, o biofilme pode apresentar diferentes locais com diferentes fases de desenvolvimento (Stoodley et al., 2002).

O biofilme maduro é caracterizado por uma arquitetura complexa que inclui canais, poros e ainda uma redistribuição das bactérias por locais afastados do substrato (Behlau and Gilmore, 2008).

### iii. Desprendimento da superfície

O desprendimento é um termo genérico usado para descrever a libertação de células (individuais ou em grupos) a partir de um biofilme ou substrato (Stoodley et al., 2002), e constitui um fator importante na disseminação de uma infeção (Stoodley et al., 2001).

O desprendimento espontâneo de células do biofilme foi dividido em dois processos, erosão e descamação, com base na magnitude e frequência deste processo. A erosão é caracterizada pelo desprendimento contínuo de uma única célula ou de pequenas porções do biofilme. Espessura do biofilme, tensão de corte, fluído e velocidade do fluído afetam a taxa de erosão (Kumar & Prasad, 2006). Por outro lado, a descamação é caracterizada pela perda rápida e maciça do biofilme (Stoodley et al., 2001).

Durante este processo, as microcolónias podem soltar-se do biofilme sob direção da tensão de corte ou por meio de uma resposta geneticamente programada que medeia o processo de desprendimento. As microcolónias deslocam-se sob o fluxo do fluído até colonizarem outras regiões do hospedeiro para formar um novo biofilme (Brady et al., 2008).

O potencial de dispersão através do desprendimento é uma vantagem para o desenvolvimento do biofilme uma vez que permite a existência de uma população bacteriana duradoura, resistente a agentes antimicrobianos e a uma resposta imune do hospedeiro, enquanto que, simultaneamente, promove a dispersão contínua incentivando a propagação de bactérias (Brady et al., 2008).

A extrema necessidade de nutrientes pode levar ao desprendimento por um mecanismo que é ainda desconhecido mas que permite às bactérias a procura de ambientes ricos em nutrientes (Stoodley et al., 2002).

A libertação de bactérias de um biofilme parece ser um evento fisiológico regulado. Após a maturação do biofilme, os níveis de matriz EPS aparentam diminuir, talvez devido ao metabolismo, com subsequente desprendimento de porções do biofilme ou de células individuais. O aumento da concentração de moléculas indutoras pode ser um fator responsável pela libertação de enzimas que degradam a matriz polimérica, resultando no desprendimento de células do biofilme (Behlau and Gilmore, 2008).

É possível identificar três tipos distintos de estratégias de dispersão de um biofilme: (*swarming/seeding dispersal*) onde as células vão sendo libertadas, individualmente, das microcolónias; (*clumping dispersal*) onde os agregados de células são espalhados em forma de massa compacta e dispersão de superfície (*surface dispersal*), sob a qual as células do biofilme se vão movendo (Hall-Stoodley et al., 2004).

#### **4. Fatores que influenciam a formação de biofilmes**

A fixação de microrganismos a superfícies para o desenvolvimento de biofilmes é um processo muito complexo, afetado por diversas variáveis (Tabela 2) (Simões et al., 2010).

Alguns fatores que influenciam a fixação de bactérias às superfícies são a disponibilidade de nutrientes na superfície e a sua concentração, pH disponível, temperatura, concentração de eletrólitos, osmolaridade, o fluxo de materiais e tipos de superfície, variando consoante as espécies (Behlau and Gilmore, 2008; Kumar and

Prasad, 2006). Fatores como a disponibilidade de superfície, propriedades da célula, estímulos ambientais e regulação de genes também interferem na formação de um biofilme (Prakash et al., 2003).

**Tabela 2** - Variáveis envolvidas na adesão de células, formação e desenvolvimento de biofilmes (adaptado de Simões et al., 2010)

<b>Superfície de adesão</b>	<b>Fluído</b>	<b>Célula</b>
Textura ou rugosidade	Velocidade do fluido	Hidrofobicidade da superfície celular
Hidrofobicidade	pH	Apêndices extracelulares
Composição química da superfície	Temperatura	EPS
Carga	Catiões	Moléculas sinalizadoras
Filme condicionador	Presença de agentes antimicrobianos	
	Disponibilidade de nutrientes	

i. Superfície

A superfície pode ser um tecido vivo ou morto, ou qualquer superfície inerte, e pode ter várias características que são importantes no processo de adesão. A colonização microbiana parece aumentar com o aumento da rugosidade da superfície. Isto deve-se à menor intensidade das forças de corte e à área de superfície ser maior em superfícies mais ásperas (Kokare et al., 2009; Prakash et al., 2003). A maioria dos pesquisadores descobriu que os microrganismos aderem mais rapidamente a superfícies hidrofóbicas apolares (Teflon e outros plásticos) do que a materiais hidrofílicos (vidro e metais) (Prakash et al., 2003).

ii. Propriedades da célula

Propriedades da superfície celular, particularmente a hidrofobicidade da superfície; a presença de apêndices extracelulares (fímbrias e flagelos, estruturas proteicas da

superfície (*curli*), proteínas da membrana externa (OMPs)); interações envolvidas na comunicação célula-célula e produção de EPS, influenciam a taxa e extensão da adesão de células microbianas (Prakash et al., 2003) e são importantes para a formação e desenvolvimento de biofilmes. Eventualmente, também poderão fornecer uma vantagem competitiva para um organismo, onde uma comunidade mista está envolvida (Pasternak et al., 2003; Simões et al., 2010).

A hidrofobicidade da superfície celular é importante na adesão porque as interações hidrofóbicas tendem a aumentar com a natureza apolar cada vez maior de uma ou ambas as superfícies envolvidas (a superfície da célula microbiana e a do substrato) (Donlan, 2002; Prakash et al., 2003; Simões et al., 2010).

Flagelos, quando existentes, são responsáveis pela motilidade das bactérias e importantes para superar as forças que as repelem, impedindo que cheguem a muitos materiais abióticos (Prakash et al., 2003). Desempenham um papel importante nos estágios iniciais de fixação de bactérias, sendo responsáveis pelo transporte e interações iniciais entre célula-superfície (superando as forças repulsivas associadas ao substrato) (Prakash et al., 2003; Simões et al., 2010).

Pili ou fímbrias são encontrados em muitas bactérias Gram-negativas, incluindo espécies de *Pseudomonas*. A sua única função conhecida é promover uma maior aderência das células, uma vez que as bactérias com pili têm a capacidade de aderir fortemente a outras células bacterianas e a partículas inorgânicas. No entanto, eles não estão sempre envolvidos no processo de fixação, mesmo se estiverem presentes. De acordo com Sauer e Camper (*cit. in* Simões et al., 2010), pili e estruturas associadas, têm-se mostrado importantes para a adesão e colonização de superfícies, provavelmente por superar a barreira de repulsão eletrostática inicial que existe entre a célula e o substrato (Simões et al., 2010).

A função frequentemente atribuída às EPS é o seu efeito protetor geral sobre os microrganismos do biofilme contra condições adversas. Como exemplo, tem sido frequentemente observado que as células do biofilme podem tolerar altas concentrações de biocidas. Supõe-se que isto esteja relacionado, principalmente, com características fisiológicas das bactérias do biofilme, mas também com a função de barreira de EPS

(Simões et al., 2010). A matriz de EPS atrasa ou impede que os agentes antimicrobianos penetrem no biofilme e consigam chegar a microrganismos alvo por limitação da difusão e/ou interação química com as proteínas extracelulares e polissacarídeos (Simões et al., 2010).

### iii. Hidrodinâmica

Os biofilmes foram examinados sob diferentes condições hidrodinâmicas, tais como fluxo laminar e turbulento, verificando-se que a sua resposta era alterada consoante o tipo de fluxo ao qual eram submetidos (Kokare et al., 2009).

Biofilmes submetidos a fluxo laminar crescem de forma irregular e consistem em agregados de células rugosos separados por vazios intersticiais. Por outro lado, biofilmes submetidos a fluxo turbulento, apesar de também crescerem de forma irregular, apresentam uma forma mais alongada (*Streamers*) (microcolónias filamentosas do biofilme, que se encontram ligadas à superfície pela parte a montante (cabeça), ficando a parte a jusante (cauda) a oscilar na corrente) que oscilam no fluído (Figura 2). A associação de células com a superfície depende do tamanho da célula e da motilidade celular (Kokare et al., 2009).

A sua formação ocorre, preferencialmente, em ambientes com elevada tensão de corte (meios que fluem rapidamente). Se o fluxo for elevado, significa que o fluído flui de forma turbulenta; se o fluxo for baixo, prevalecem as condições de fluxo laminar. Especula-se que o fluxo turbulento aumenta a adesão bacteriana e a formação de biofilmes, por aumento das colisões entre bactérias planctónicas e a superfície (Donlan and Costerton, 2002).

### iv. Nutrientes

Os canais de água fornecem meios efetivos na troca de nutrientes e metabolitos com o meio, melhorando a disponibilidade de nutrientes bem como a remoção de potenciais metabolitos tóxicos. A proximidade entre as diferentes comunidades microbianas facilita a troca, remoção e distribuição de produtos metabólicos entre as espécies e o substrato (Kokare et al., 2009).

Um aumento na concentração de nutrientes está correlacionado com um aumento no número de células bacterianas associadas. No entanto, mesmo concentrações de nutrientes demasiado baixas para medir, são suficientes para o crescimento do biofilme (Prakash et al., 2003). Uma vez que a matriz do biofilme se encontra carregada negativamente, muitos nutrientes (particularmente catiões) são atraídos para a superfície do biofilme. Além disso, os nutrientes com carga negativa podem trocar com iões na superfície. Isto proporciona células bacterianas dentro do biofilme com abundância de alimentos em comparação com outras ao seu redor (Prakash et al., 2003).

v. Estímulos ambientais

Outras características do meio aquoso, como pH, ferro, oxigénio, força iónica e temperatura, podem desempenhar um papel na taxa de adesão microbiana a um substrato. Vários estudos têm demonstrado um efeito sazonal na fixação de bactérias e formação de biofilme em diferentes sistemas aquosos. Este efeito pode ser devido à temperatura da água ou a outros parâmetros afetados sazonalmente (Donlan, 2002; Prakash et al., 2003). Verifica-se que um aumento na concentração de diversos catiões, como sódio, cálcio, lantânio, iões férricos, afetam a fixação de *P. fluorescens*, reduzindo as forças de repulsão entre a célula e a superfície (Kokare et al., 2009).

vi. Regulação e transferência de genes

A força motriz do desenvolvimento da comunidade bacteriana é a auto-organização e cooperação entre as células, em vez da clássica seleção natural competitiva de microrganismos individuais (Simões et al., 2010).

As bactérias podem tornar-se resistentes aos antimicrobianos por mutação espontânea ou através da aquisição de informação genética de outras bactérias (Ferreira et al., 2010) através da troca de plasmídeos por conjugação no interior do biofilme (Donlan and Costerton, 2002).

A conjugação (mecanismo de transferência de plasmídeos) ocorre numa taxa maior entre as células em biofilmes do que entre as células planctónicas uma vez que é favorecido pela proximidade física das células nas microcolónias (Donlan and Costerton, 2002). Ghigo (*cit. in* Donlan, 2002) tem sugerido que as cadeias de bactérias

cl clinicamente relevantes que contêm plasmídeos são capazes de desenvolver mais rapidamente biofilmes. Na ausência de plasmídeos, esses mesmos organismos produziam apenas microcolônias sem qualquer desenvolvimento (Donlan, 2002).

A transferência horizontal de genes é importante para a evolução e diversidade genética das comunidades microbianas ao invés de acumulação de modificações genéticas por mutação. Os elementos genéticos móveis que medeiam a transferência de genes podem ser plasmídeos, transposões (sequências de DNA que se podem mover para novas posições dentro do genoma de uma única célula) ou bacteriófagos (Kokare et al., 2009). Por isso se diz que as bactérias no interior de um biofilme expressam diferentes características fenotípicas quando comparadas com os seus homólogos planctônicos. Isto deve-se aos diferentes genes transcritos na vida planctônica e nas diferentes fases do ciclo de vida bacteriano num biofilme (Kokare et al., 2009).

## 5. Quorum sensing como adjuvante na formação de biofilmes

A bem-sucedida adaptação das bactérias às mudanças das condições naturais é dependente da sua capacidade de perceber e responder ao ambiente externo e modular a expressão do gene em conformidade (Simões et al., 2010).

A formação de estruturas complexas é coordenada através de um sistema de comunicação célula-célula entre bactérias de um biofilme através de sinais químicos (Simões et al., 2010). Este mecanismo de sinalização celular, dependente da densidade, é conhecido como *quorum sensing* (*QS*); através do qual as bactérias regulam a expressão de conjuntos de genes especializados em resposta à densidade celular (Behlau and Gilmore, 2008; Rumjanek et al., 2004).

Entre 1% e 10% dos genes de bactérias são regulados pelo processo de *quorum sensing* (Behlau and Gilmore, 2008).

A formação de biofilmes tem sido considerada uma resposta ao mecanismo de *QS* (Rumjanek et al., 2004). Uma série de outras atividades microbianas importantes estão também associadas a este mecanismo, e incluem: biossíntese de enzimas extracelulares,

biossíntese de antibióticos, a produção de biosurfactantes, transferência de plasmídeos por meio de conjugação, a síntese de EPS e fatores de virulência extracelulares em bactérias Gram-negativas (Rumjanek et al., 2004, Simões et al., 2010).

Este mecanismo é conseguido através da produção de uma molécula autoindutora (AI) pelas células bacterianas, que atravessa as células por difusão e acumula-se no ambiente em quantidade proporcional ao crescimento celular, conseguindo ativar os genes e levando em vigor os fenótipos em questão. (Behlau and Gilmore, 2008; Gera and Srivastava, 2006). Por meio deste mecanismo, a bactéria é capaz de detectar a concentração de autoindutores e, desta maneira, perceber o tamanho da população (Rumjanek et al., 2004).

## **6. Espécies microbianas relevantes para a formação de biofilmes**

### **i. Bactérias Gram-positivas**

Os organismos Gram-positivos são responsáveis pela maioria das infecções associadas ao osso e articulações (Darley and MacGowan, 2004).

*Staphylococcus spp.* possuem a capacidade de produzir um biofilme de múltiplas camadas, incorporado num glicocálice, que se desenvolve em tecido ou osso desvitalizado ou em dispositivos médicos implantados, produzindo assim infecção (Brady et al., 2008).

Cocos Gram-positivos e, em particular, *Staphylococcus spp.* são predominantes entre os organismos responsáveis por complicações infecciosas após cirurgia de enxertos vasculares ou implantação de próteses (O’Gara and Humphreys, 2001).

#### **✓ *Staphylococcus aureus***

*Staphylococcus aureus* é uma bactéria Gram-positiva, ubiqüitária, comensal da flora nasal, colonizando permanentemente cerca de 20% da população, sendo que 60% são portadores transitórios desta mesma bactéria (Brady et al., 2008).

Apresenta-se na forma de cocos, desprovidos de motilidade e com ausência de formação de esporos. É uma bactéria anaeróbia facultativa e coagulase positiva, o que possibilita a coagulação do plasma *in vitro* e também permite a sua distinção entre outras espécies de *Staphylococcus* (*S. epidermidis*) (Brady et al., 2006).

Sendo esta bactéria considerada de alta virulência, está relacionada com a maioria das infecções (Bertucci and Tedrus, 2010). O seu rápido desenvolvimento e apresentação de inúmeras resistências aos antibióticos, e a capacidade de, a partir de infecção aguda evoluir para infecção crônica e persistente, continua a merecer uma atenção considerável (Brady et al., 2008). A produção de exotoxinas é o principal fator de virulência destas bactérias (Bertucci and Tedrus, 2010).

A incidência de infecção por *S. aureus* tornou-se mais preocupante com o aparecimento de várias estirpes resistentes a antibióticos, tais como MRSA (*S. aureus* resistentes à meticilina). Aproximadamente, 40 a 60% das infecções associadas a *S. aureus* adquiridas via nosocomial, são agora consideradas endêmicas em hospitais (Brady et al., 2006).

Infeções causadas por *S.aureus* (MRSA), associadas com o uso de dispositivos ortopédicos, são um problema clínico bastante significativo, apresentando elevada morbidade, mortalidade e custos de saúde. Mesmo com a utilização de rigorosos procedimentos de assepsia e uso adequado de antibióticos, tais infecções continuam a ocorrer, muitas vezes levando a complicações comuns, tais como osteomielite (Bahna et al., 2007).

Esta estirpe bacteriana é capaz de causar osteomielite aguda, uma vez que é um potencial patogéneo do osso, cuja adesão de moléculas facilita tanto a sua ligação à matriz óssea, como a secreção de toxinas capazes de estimular a reabsorção óssea. Esta bactéria não apenas coloniza a matriz óssea, como também é internalizada pelos osteoblastos (células responsáveis pela síntese do tecido ósseo) (Ellington et al., 2006). A infecção pode depois progredir e tornar-se crônica devido à sua capacidade para invadir e sobreviver dentro dos osteoblastos e para desenvolver rapidamente resistência aos antibióticos e expressar o seu arsenal de fatores de virulência de forma programada, contribuindo para que 80% dos casos de osteomielite crônica sejam causados por *S.aureus* (Brady et al., 2006, Ellington et al., 2006).

✓ *Staphylococcus epidermidis*

*Staphylococcus* coagulase-negativo e, em particular, *S. epidermidis*, surgiram como principais patógenos nosocomiais associados a infecções de dispositivos médicos implantáveis (O’Gara and Humphreys, 2001; Sousa et al., 2008) e são responsáveis por infecções pós-prótese, tendo como principal responsável pela sua resistência e sobrevivência a presença de glicocálice (Bertucci and Tedrus, 2010).

Estes organismos oportunistas, comensais da pele e microflora das membranas mucosas, são capazes de causar infecções graves em hospedeiros imunocomprometidos ou portadores de dispositivos médicos implantados, como próteses ortopédicas, apresentando problemas específicos no diagnóstico e tratamento destas infecções que envolvem formação de biofilmes em biomateriais implantados e constituem um importante fator de virulência (O’Gara and Humphreys, 2001; Sadvskaya et al., 2006; Sousa et al., 2008). Infecções causadas por *S. epidermidis* são frequentemente persistentes e recidivantes (O’Gara and Humphreys, 2001).

A nível bioquímico, adesinas polissacarídicas extracelulares desempenham um papel essencial na aderência bacteriana inicial e adesão intercelular (formação de biofilme), representando um fator de virulência desta espécie bacteriana. Dois principais polissacarídeos produzidos por *S. epidermidis* são a adesina polissacarídica capsular (PSA) e a adesina polissacarídica intercelular (PIA) (O’Gara and Humphreys, 2001).

ii. Bactérias Gram-negativas

As bactérias Gram-negativas que se encontram no interior dos biofilmes presentes em dispositivos médicos de longa permanência apresentam a capacidade de produzir endotoxinas que desencadeiam uma resposta imunológica no paciente (Donlan and Costerton, 2002).

No geral, bactérias Gram-negativas são mais resistentes a biocidas do que as Gram-positivas e essa diferença de sensibilidade tem sido atribuída ao fato das primeiras possuírem uma membrana adicional exterior (OM), que atua como uma barreira de permeabilidade extra. A presença de lipopolissacarídeos (LPS) moléculas do folheto externo impede o acesso das moléculas hidrofílicas (incluindo antibióticos e biocidas)

para o interior da célula. Além disso, neste OM, há um grande número de proteínas (proteínas de membrana externa (OMPs) que, embora sejam responsáveis pela entrada de antimicrobianos hidrofóbicos para a célula, estão associados à resistência bacteriana (Ferreira et al., 2010).

✓ *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria aeróbia, em forma de bacilo, ubiqüitária e encontrada em diversos ambientes. É um patógeno oportunista que, tal como outras bactérias Gram-negativas, tem um sistema de regulador designado por *quorum sensing*, que controla a expressão de inúmeros genes, muitos deles associados à formação de biofilmes e produção de fatores de virulência (Bollinger et al., 2001; Hall-Stoodley and Stoodley, 2009; Kokare et al., 2009).

Trata-se do agente etiológico Gram-negativo mais frequente, associado a infecções de implantes ortopédicos, representando 10% dos microrganismos envolvidos nas infecções de próteses da anca (Broqui et al., 1995).

Para bactérias móveis, como é o caso da *Pseudomonas*, um evento que ocorre imediatamente antes da sua adesão irreversível a uma superfície, é a mudança da motilidade mediada por flagelos (*flagella-based motility*) para motilidade lateral associada a superfícies (*twitching motility*). Esta mobilidade permite a redistribuição das células aderidas, permitindo que as bactérias colonizem áreas adjacentes da superfície. O *swarming* é outro mecanismo usado por algumas estirpes (Behlau and Gilmore, 2008).

Biofilmes de *P. aeruginosa* são comunidades desenvolvidas de bactérias incorporadas numa matriz polissacarídica extracelular, naturalmente resistentes ao tratamento antimicrobiano. O modelo de desenvolvimento envolve a fixação inicial a uma superfície sólida, a formação de microcolônias sobre a superfície e a diferenciação das microcolônias formando o biofilme maduro (Costerton et al., 1999).

## **II. Importância da existência e estudo dos biofilmes**

Através de análises microscópicas, descobriu-se que, no mundo natural, mais de 99,9% das bactérias cresce em biofilmes numa vasta variedade de superfícies, incluindo tecidos vivos, dispositivos médicos de longa permanência, sistema de canalização de água potável, ou sistemas aquáticos naturais (Donlan and Costerton, 2002; Prakash et al., 2003) e que, para além disso, crescem de modo diferente após aderirem a uma superfície sólida (Costerton, 1999) e iniciarem a formação do biofilme com a produção de uma camada viscosa e escorregadia (Costerton et al., 1999).

Apesar de desempenharem um papel crucial em muitos processos (como a biodegradação de poluentes ambientais ou o equilíbrio microbiano dentro de um organismo), muitas vezes os biofilmes não são desejados e causam sérios problemas em várias áreas, incluindo campos industriais e biomédicos, podendo levar ao aumento dos custos de produção e manutenção, bem como à saúde pública e aos impactos e preocupações ambientais. Todos estes aspetos levam a um aumento do uso de agentes antimicrobianos para controlar a formação de biofilmes não desejados (Ferreira et al., 2010).

A formação de um biofilme é importante porque o seu modo de crescimento está associado à natureza crónica das infecções posteriores e à sua inerente resistência à terapêutica antimicrobiana (Stewart and Costerton, 2001). Ou seja, os biofilmes apresentam um papel significativo no aparecimento de doenças infecciosas (Donlan and Costerton, 2002).

Devido ao envelhecimento da população e à crescente necessidade da utilização de dispositivos médicos para substituir e/ou para reparar tecidos, as infecções associadas a biofilmes tendem a aumentar consideravelmente (Behlau and Gilmore, 2008). Como tal, uma melhor compreensão acerca do comportamento do biofilme é particularmente importante devido aos vários problemas associados à sua presença. Uma vez desenvolvidos, os biofilmes são mais difíceis de remover completamente (Simões et al., 2007).

## 1. Relação entre a formação de biofilmes e o aparecimento de doenças

A maior parte das infecções bacterianas envolvem a formação de biofilmes (Behlau and Gilmore, 2008). Especialistas do Centro de Controle de Doenças e Prevenção estimam que 65% das infecções bacterianas desenvolvidas em humanos pressuponham a formação de biofilmes (Tabela 3) (Prakash et al., 2003).

Embora vários estudos mostrem que a formação de biofilmes não é necessariamente a causa de infecções persistentes, estes são de difícil erradicação e, portanto, merecem uma atenção especial (Brady et al., 2008). Deste modo, têm vindo a ser desenvolvidas estratégias antimicrobianas, com o objetivo de controlar as infecções agudas causadas por estas bactérias planctónicas provenientes do biofilme (Fux et al., 2003).

A formação de biofilmes e posterior desenvolvimento de uma patologia é um processo particularmente relevante nos pacientes imunocomprometidos, nos quais a capacidade de combater organismos patogénicos invasores se encontra deficiente (Donlan and Costerton, 2002).

**Tabela 3** - Lista parcial das infecções humanas que envolvem biofilmes (adaptado de Fux et al., 2005)

<b>Infeção/Doença</b>	<b>Espécies bacterianas envolvidas</b>
Cáries Dentárias	Cocos Gram-positivos acidogénicos, <i>Streptococcus sp.</i>
Periodontite	Bactérias orais anaeróbias Gram-negativas
Otite média	<i>Haemophilus influenzae</i>
Amigdalite crónica	Várias espécies
Pneumonia/Fibrose cística	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Burkholderia cepacia</i>
Endocardite	<i>Streptococcus</i> grupo Viridans, <i>Staphylococcus</i>
Fascite necrotizante	<i>Streptococcus</i> grupo A
Infeções musculoesqueléticas	Cocos Gram-positivos
Osteomielite	Várias espécies
Infeções do trato biliar	Bactérias entéricas
Pedra nos rins infecciosa	Bacilos Gram-negativos
Prostatite bacteriana	<i>E. coli</i> e outras Gram-negativas

Os mecanismos pelos quais os organismos presentes no biofilme são capazes de provocar determinada doença no organismo hospedeiro incluem: i) despreendimento de células ou agregados de células do biofilme de dispositivos médicos de longa permanência, resultando em infecções na corrente sanguínea ou trato urinário; ii) produção de endotoxinas; iii) resistência ao sistema imune do hospedeiro; iv) troca de plasmídeos resistentes entre células do biofilme, v) redução da suscetibilidade aos agentes antimicrobianos (Donlan, 2002; Donlan and Costerton, 2002).

## **2. Biofilmes e infecções associadas a dispositivos médicos**

As infecções associadas a dispositivos médicos foram as primeiras infecções clínicas a serem identificadas como tendo etiologia de biofilme, em que a sua formação poderia ser facilitada pela resposta inflamatória do hospedeiro, devido às suas moléculas inflamatórias facilitarem a aderência à superfície do dispositivo (Hall-Stoodley et al., 2004).

Estes biofilmes foram observados pela primeira vez no início dos anos 80, onde a microscopia eletrônica revelou a presença de bactérias depositadas na sua superfície (Hall-Stoodley et al., 2004).

De acordo com Das et al. (*cit. in* Nishimura et al., 2006), os biofilmes desempenham um papel importante na infecção crônica associada a dispositivos médicos implantados (Nishimura et al., 2006), uma vez que uma grande percentagem das infecções hospitalares, cerca de 60%, está relacionada com a formação de biofilmes nestes dispositivos (Behlau and Gilmore, 2008).

Os dispositivos próstéticos de longa permanência têm sido fundamentais a salvar vidas e têm aumentado a qualidade de vida de muitos pacientes, mas a presença de um corpo estranho no organismo predispõe e dificulta a erradicação de infecções bacterianas e fúngicas (Behlau and Gilmore, 2008), representando um problema para as pessoas que necessitam destes dispositivos (Costerton et al., 1999; Donlan and Costerton, 2002).

A natureza de um corpo estranho invasivo (*indwelling foreign body*), tanto um dispositivo implantado como um objeto que entra através de um trauma, influencia profundamente a dinâmica patogénico-hospedeiro. A simples presença de um corpo estranho possibilita que uma pequena quantidade de inóculo cause infecção; permite que um organismo não-patogénico colonize o corpo estranho, infetando-o; permite que um patogénico persista indetetável no local da infecção; induz uma resposta inflamatória crónica local e limita a indução e efetividade de uma resposta humoral na presença de infecção crónica e persistente (Behlau and Gilmore, 2008).

Embora os dispositivos médicos possam diferir amplamente no *design* e nas características de utilização, fatores específicos como a duração de utilização, número e tipo de organismos à qual o dispositivo está exposto, a taxa de fluxo e a composição do meio, o material de construção do dispositivo e características físico-químicas da superfície, determinam a suscetibilidade de um dispositivo para a contaminação microbiana e formação de um biofilme (Donlan, 2001). Uma vez que as células bacterianas aderem irreversivelmente e produzem polissacarídeos extracelulares para desenvolver um biofilme, a taxa de crescimento é influenciado pela taxa de fluxo, pela composição de nutrientes do meio, pelo agente antimicrobiano, pela concentração e temperatura ambiente (Donlan, 2001).

Várias infecções nosocomiais como as relacionadas com o uso de cateteres venosos centrais, cateteres urinários, próteses de válvulas cardíacas, e dispositivos ortopédicos, estão associadas a biofilmes que aderem à superfície dos biomateriais (Tabela 4) (Davey and O'Toole, 2000; Stewart and Costerton, 2001).

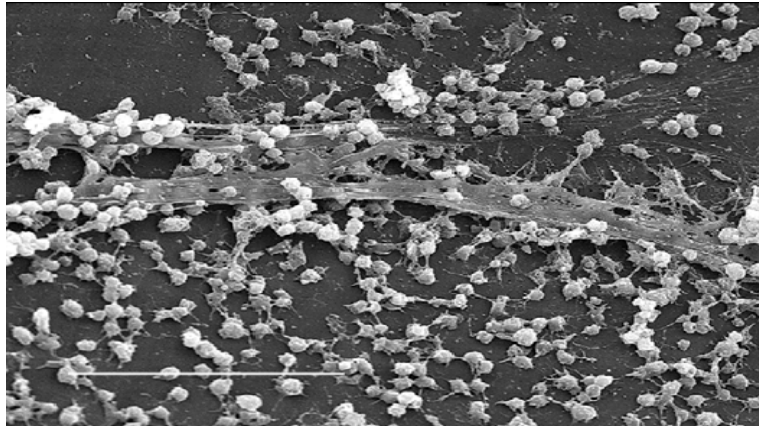
A erradicação de uma infecção provocada por formação de biofilmes é possível, quando implementada antibioticoterapia tão cedo quanto possível, e se for usada a concentração adequada e suficiente de antibiótico para tratar a infecção. Qualquer atraso na implementação desta terapia pode resultar na falha do tratamento (Prakash et al., 2003).

**Tabela 4** - Exemplos de infecções comuns associadas a implantes (adaptado de Davey and O’Toole, 2000)

<b>Tipo de implante</b>	<b>Organismo(s) encontrado(s)</b>	<b>Doença associada/consequências</b>
Prótese de válvula cardíaca	<i>S. epidermidis</i> , <i>S. sanguis</i>	Endocardite
Lentes de contacto	<i>P. aeruginosa</i> , <i>S. epidermidis</i>	Ceratite
Cateter intravascular	<i>S. epidermidis</i> , <i>S. aureus</i>	Septicémia, Endocardite
Coração totalmente artificial	<i>P. aeruginosa</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>S. aureus</i>	Septicémia, Falha do dispositivo
Cateter urinário	<i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>Proteus mirabilis</i>	Bacteriúria
Prótese de articulação	<i>S. epidermidis</i> , <i>S. aureus</i>	Septicémia, Falha do dispositivo
Tubo endotraqueal	<i>P. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>S. aureus</i>	Pneumonia
Prótese das cordas vocais	<i>Streptococcus</i> , <i>Staphylococcus</i>	Falha da prótese

Os biofilmes presentes em dispositivos médicos podem ser compostos por bactérias Gram-positivas (*Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Streptococcus viridans*) ou Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa*) ou, ainda, leveduras (Figura 4) (Donlan, 2001).

Estes organismos podem ter origem na pele de pacientes ou profissionais de saúde, da água da torneira, ou de outras fontes no ambiente. Os biofilmes podem ser compostos por uma única espécie ou por diversas espécies, dependendo do dispositivo e do tempo que permanece no organismo do paciente (Donlan, 2001).



**Figura 4** - Imagem de um biofilme de *Staphylococcus spp.* na superfície interna de um dispositivo médico de longa permanência (adaptado de Donlan, 2002)

### **III. Mecanismos de resistência e tolerância dos biofilmes ao tratamento antimicrobiano**

Numa perspectiva médica, o aspeto mais importante das bactérias de um biofilme é a sua capacidade de resistência à eliminação por qualquer mecanismo de defesa do hospedeiro ou mesmo pela intensa terapia antimicrobiana por longos períodos de tempo (Ehrlich et al., 2005).

Os biofilmes bacterianos são extremamente difíceis de detetar em diagnósticos de rotina e, para além disso, facilitam a propagação das resistências aos antibióticos através da promoção da transferência horizontal de genes (Fux et al., 2005). São portanto, a raiz de muitas infeções bacterianas persistentes clinicamente importantes (Fux et al., 2003; Hall-Stoodley and Stoodley, 2009).

Estas resistências para com os ataques, sejam do hospedeiro ou de cariz farmacológico, resultam, em parte, devido ao facto do biofilme bacteriano conter uma grande diversidade de nichos ambientais no que diz respeito à disponibilidade de nutrientes, pH e tensão O<sub>2</sub> (Ehrlich et al., 2005) e à diminuição da penetração dos antibióticos devido às interações com a matriz exopolissacarídica (Carmen et al., 2005; Holmberg et al., 2009). Portanto, o facto de as bactérias possuírem uma pluralidade fenotípica garante a sobrevivência de algumas a qualquer tipo de tratamento antimicrobiano com base em considerações metabólicas (Ehrlich et al., 2005).

De acordo com Ceri et al. (*cit. in* Nishimura et al., 2006), as bactérias presentes num biofilme apresentam um aumento drástico da resistência a agentes antimicrobianos, quando comparadas com bactérias planctónicas (Nishimura et al., 2006), conseguindo suportar concentrações de antibióticos 1000 vezes superiores aos níveis letais para bactérias planctónicas, sugerindo que as células num biofilme poderão ter uma atividade metabólica alterada (Behlau and Gilmore, 2008; Stewart and Costerton, 2001).

Essa atividade metabólica alterada realmente verifica-se, uma vez que, nem todas as células recebem a mesma quantidade de nutrientes dentro do biofilme. Esta limitação de nutrientes irá reduzir as taxas de crescimento (estado de crescimento lento), originando

diferentes estados metabólicos, o que torna as bactérias menos suscetíveis aos antimicrobianos (Ferreira et al., 2010).

Para além de muitos outros investigadores, Costerton et al. (1999) e Prakash et al. (2003) propuseram várias hipóteses para explicar esta resistência, embora não necessariamente limitada aos seguintes aspetos (Figura 5):

O primeiro mecanismo consiste na dificuldade de qualquer agente conseguir penetrar o biofilme na sua total profundidade (Costerton et al., 1999; Prakash et al., 2003). Esta dificuldade deve-se à presença de EPS, constituintes da matriz do biofilme que, embora possa não inibir totalmente a penetração de antibióticos no biofilme, pode atuar como barreira física/química retardando a difusão dos antibióticos e diminuindo a taxa de difusão de outros solutos, suficientemente para induzir a expressão de genes dentro do biofilme que medeiam a resistência (Costerton et al., 1999; Hall-Stoodley and Stoodley, 2009; Prakash et al., 2003). Também a carga de polímeros e enzimas degradantes de antibióticos (beta-lactamases) na matriz, que são produzidas em resposta à exposição de antibióticos, podem levar a ligação e/ou desativação de moléculas de antibióticos que estão a tentar alcançar as células inclusas no biofilme (Fux et al., 2005; Hall-Stoodley and Stoodley, 2009; Prakash et al., 2003).

Os antibióticos têm mostrado fácil penetração nos biofilmes em alguns casos. No entanto, podem também apresentar difícil penetração dependendo do tipo de agente antimicrobiano, do tipo de bactéria e do tipo de biofilme (Costerton et al., 1999; Hall-Stoodley and Stoodley, 2009).

Suci et al. (*cit. in* Donlan and Costerton, 2002) demonstraram ocorrência de uma penetração tardia de ciprofloxacina em biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa*. O que normalmente demorava 40 segundos numa superfície estéril, passou a demorar 21 minutos numa superfície contendo biofilme (Donlan and Costerton, 2002).

Uma segunda hipótese para explicar a reduzida suscetibilidade dos biofilmes aos antibióticos baseia-se no facto de algumas das células do biofilme atravessarem um período de limitação de nutrientes levando a um crescimento lento ou até mesmo à sua estagnação (fase estacionária semelhante a dormência), podendo contribuir para a

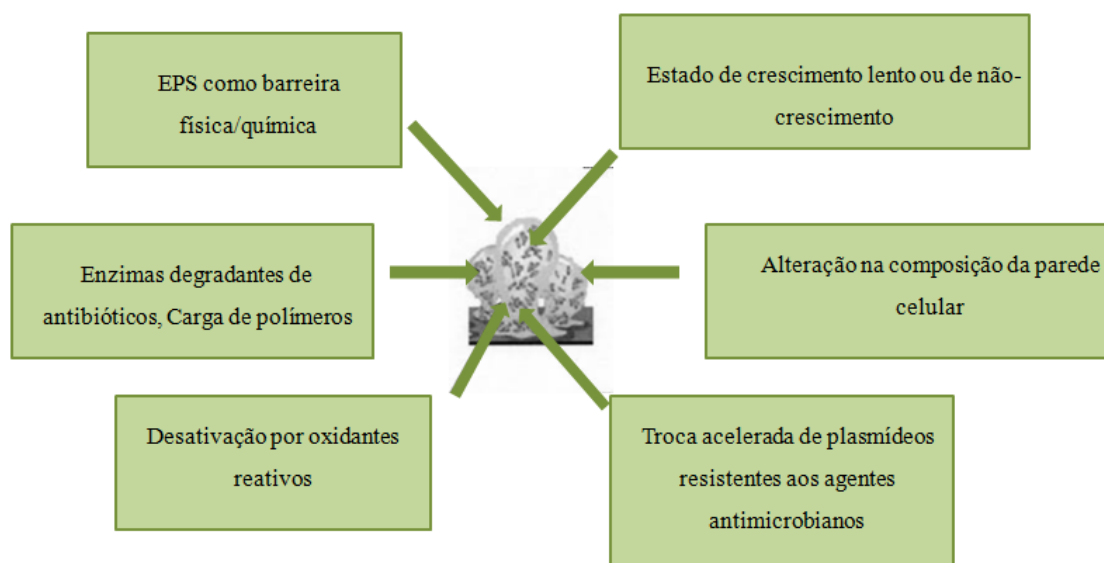
expressão de resistência generalizada ou tolerância aos antibióticos (Costerton et al., 1999; Hall-Stoodley and Stoodley, 2009; Prakash et al., 2003).

O terceiro mecanismo é considerado o mais especulativo relativamente às hipóteses anteriores e postula que, pelo menos algumas das células do biofilme adotam um fenótipo distinto e protegido. Este fenótipo não é uma resposta à limitação de nutrientes, mas sim uma resposta biologicamente programada para o crescimento numa superfície (Costerton et al., 1999; Stewart and Costerton, 2001).

Em quarto lugar, até 40% da composição proteica da parede celular de bactérias em biofilmes, é alterada relativamente às dos seus homólogos planctônicos, possibilitando bombear os antibióticos antes que possam exercer a sua função (Prakash et al., 2003).

Por último, o agente antimicrobiano é desativado por oxidantes reativos nas camadas mais externas do biofilme, mais rapidamente do que se difunde (Prakash et al., 2003).

Biofilmes também proporcionam um nicho ideal para a troca de DNA extracromossômico responsável pela resistência aos antibióticos, fatores de virulência e capacidade de sobrevivência ambiental em taxas aceleradas, tornando-se um perfeito meio para a emergência das resistências (Prakash et al., 2003).



**Figura 5** - Ilustração dos mecanismos de resistência antimicrobiana por um biofilme maduro (adaptado de Prakash et al., 2003)

A concentração mínima inibitória (CMI) e a concentração mínima com poder bactericida (CMB) são valores padrão em testes de suscetibilidade aos antimicrobianos e servem como referências importantes no tratamento de infecções agudas. Especificamente, estes parâmetros avaliam o efeito dos antibióticos contra organismos planctônicos que se encontram em fase de crescimento exponencial (Fux et al., 2003).

Num estudo realizado por Nishimura et al. (2006), embora os agentes antimicrobianos tenham mostrado efetividade em bactérias planctônicas, os valores de CMB, referentes às bactérias presentes no biofilme foram elevados para todos os agentes antimicrobianos, demonstrando assim que o tratamento com estes agentes é, geralmente, ineficaz após a formação do biofilme (Nishimura et al., 2006).

Em geral, concentrações de antibióticos 10 a 100 vezes acima da CMI são necessárias para atingir efeito bactericida sobre patógenos em fase de crescimento lento no interior do biofilme, o que impossibilita a erradicação dos agentes causadores da infecção somente com antibióticos (Salles, 2008).

A escolha inicial do antibiótico mais adequado ao tratamento depende inevitavelmente do patógeno causador da infecção e do seu padrão de sensibilidade (Darley and MacGowan, 2004). A maior parte dos antibióticos, é mais eficaz em matar rapidamente células em crescimento do que células em fase estacionária (Fux et al., 2003). O sucesso do tratamento deste tipo de infecções depende, a longo prazo, da terapia com elevadas doses de antibióticos e da remoção de qualquer objeto estranho ao organismo (Fux et al., 2005).

Contudo, os antibióticos podem suprimir sintomas de infecção ao matarem as bactérias livremente suspensas que vão sendo libertadas, mas não conseguem erradicar as células bacterianas ainda incorporadas no biofilme. Após paragem do tratamento antimicrobiano, o biofilme pode agir como um foco de infecção, resultando na sua recorrência e persistindo até que a superfície colonizada seja retirada, cirurgicamente, do organismo (Stewart and Costerton, 2001).

Antibióticos beta-lactâmicos, tais como a meticilina, oxacilina e penicilina, atuam na parede celular das bactérias. Estes antibióticos inativam as transpeptidases, de modo que peptidoglicano da parede celular não possa ser sintetizado. Uma vez que esta classe de

antibióticos não é eficaz contra MRSA, glicopéptidos como a vancomicina e teicoplanina tornaram-se as drogas de escolha para o tratamento destas infecções (Brady et al., 2006).

No entanto, *S. aureus* com sensibilidade intermediária aos glicopéptidos estão a começar a surgir. Resistência aos antibióticos, especialmente resistência à metilina, normalmente resulta num atraso de terapia antimicrobiana adequada e eficaz. Este atraso aumenta as hipóteses para o desenvolvimento de osteomielite crónica e infecções associadas a implantes (Brady et al., 2006).

#### **IV. Infecções ortopédicas mais relevantes associadas à formação de biofilmes**

Hoje em dia, os implantes ortopédicos tornaram-se um componente essencial da medicina moderna e a cirurgia de implante uma das operações mais comuns devido ao sucesso deste procedimento para restaurar articulações danificadas, alívio da dor e melhoria da mobilidade (Khosravi et al., 2009; Widmer, 2001).

As infecções em próteses ortopédicas e noutros materiais implantados no corpo humano são um problema bastante significativo devido à sua morbidade e tendência para ocorrerem recaídas graves (Holmberg et al., 2009; Khosravi et al., 2009).

O fator mais importante tanto a nível clínico como económico é a prevenção da ocorrência de infeção. No entanto, uma vez estabelecida infeção, é necessário prestar ao paciente o tratamento mais rápido, agressivo e eficaz (Khosravi et al., 2009).

Devido à ascensão da esperança média de vida nos países industrializados, o número de pacientes que necessitam de implantes ortopédicos continuará a crescer, assim como o risco de desenvolverem infeções relacionadas com o seu uso (Widmer, 2001).

Implantes ortopédicos têm revolucionado o tratamento de fraturas ósseas e artrite comum não infecciosa. Hoje, o risco de infeção relacionada a dispositivos ortopédicos (ODRI) é <1%-2%, devido à segurança e biocompatibilidade destes dispositivos (Widmer, 2001).

Nos últimos anos, um grande número de pacientes obteve elevado sucesso, quando submetido a tratamentos com implantes ou próteses ortopédicas. No entanto, no pós-operatório, alguns pacientes vieram a sofrer de infeções bacterianas graves com essas próteses (Adachi et al., 2007).

Sabe-se que os materiais protéticos atuam como meio para o crescimento de microrganismos e varia segundo o tipo e estado do material, pois existem evidências de que materiais corroídos aumentam e facilitam o crescimento e estabilização do biofilme (Bertucci and Tedrus, 2010). Segundo Ramage et al. (*cit. in* Nishimura et al. 2006), a

tensão superficial, hidrofobicidade de superfície, rugosidade e composição química dos implantes, afetam a adesão bacteriana (Nishimura et al., 2006).

Infecções relacionadas com implantes desenvolvem-se mesmo aquando controlo e realização de todos os procedimentos de limpeza e desinfecção antes e após cirurgia, por pessoal especializado (Nishimura et al., 2006). Isso tem estimulado a reavaliação outras técnicas cirúrgicas e novos conceitos na terapia antimicrobiana (Bernard et al., 2003).

O tratamento para as infecções bacterianas envolve, para além de terapia com agentes antimicrobianos, remoção cirúrgica do dispositivo infetado e cirurgias reconstrutivas. Os pacientes têm que ser hospitalizados por longos períodos de tempo e podem perder a capacidade física (Adachi et al., 2007).

Como tal, uma abordagem não-cirúrgica ou minimamente invasiva é atrativa tanto para o paciente como para o médico, especialmente porque a maioria dos pacientes com próteses nas articulações são idosos e portadores de comorbidades significativas. A seleção adequada dos pacientes permite um tratamento bem sucedido da infeção, com resgate do implante. Uma avaliação cuidadosa dos pacientes, suas doenças subjacentes, o tipo de implante, a qualidade do tecido ósseo e um diagnóstico inequívoco de infeção são pré-requisitos para uma boa gestão de tais infeções (Tabela 5) (Widmer, 2001).

**Tabela 5** - Critérios para seleção de pacientes para tratamento de ODRI's com salvamento do implante  
(adaptado de Widmer, 2001)

Critérios
<ul style="list-style-type: none"><li>• Infeção aguda com sinais e sintomas <math>\leq 14-28</math> dias</li><li>• Implante estável sem sinais e sintomas de perda/rejeição</li><li>• Diagnóstico estabelecido pelo isolamento de microrganismos individuais de múltiplas espécies</li><li>• Resultados histopatológicos positivos</li><li>• Suscetibilidade dos patógenos aos agentes antimicrobianos via oral</li><li>• Agente antimicrobiano com efetividade provada em estudos com humanos ou animais</li><li>• Paciente apto e motivado para se submeter a longa terapia antimicrobiana</li></ul>

## 1. Infecções de próteses articulares (PJI)

A presença de implantes é um fator predisponente para o desenvolvimento de uma infecção uma vez que, após colocação cirúrgica do implante, é desencadeada uma resposta inflamatória cuja intensidade dependerá da composição química, forma, tamanho, estabilidade mecânica, bem como da localização do objeto (Behlau and Gilmore, 2008).

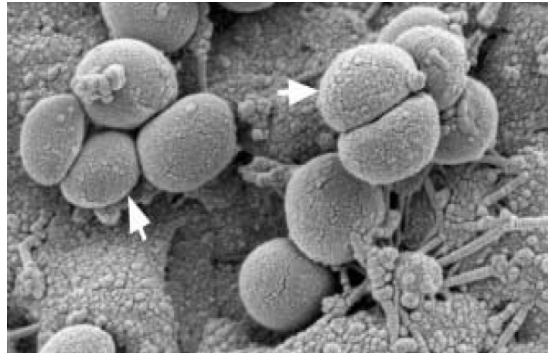
Quando a prótese é inserida no local, esta é imediatamente recoberta por proteínas do hospedeiro e por diversos constituintes sanguíneos como proteínas, macromoléculas plasmáticas, eritrócitos e plaquetas, os quais fornecem uma excelente fonte de ligação para bactérias através de uma série de eventos de interação química e física (Bertucci and Tedrus, 2010; Brady et al., 2008).

PJI é, felizmente, uma infecção pouco comum após substituição da articulação do joelho e/ou anca (Darley and MacGowan, 2004). No entanto, representam a complicação mais devastadora e problemática com elevada morbidade e custo substancial (Trampuz and Zimmerli, 2005). Para além de hospitalização prolongada, os pacientes podem apresentar o risco de complicações associadas à cirurgia, tratamento antimicrobiano por mais de seis semanas até vários meses e até remoção cirúrgica da prótese (Darley and MacGowan, 2004; Trampuz and Zimmerli, 2005).

A presença de microrganismos na superfície prostética é pré-requisito para a ocorrência de infecção associada à prótese (Bertucci and Tedrus, 2010).

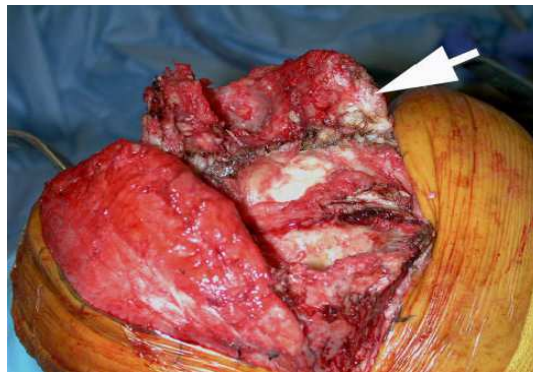
Os organismos Gram-positivos são responsáveis pela maioria das infecções do osso e articulações (Darley and MacGowan, 2004).

Os organismos patogénicos mais comumente encontrados são os *Staphylococcus* coagulase-negativo (CoNS), seguidos por *Staphylococcus aureus* (Figura 6). No entanto, quase todos os organismos podem estar envolvidos, incluindo *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Corynebacterium*, Enterobactérias e anaeróbios (Darley and MacGowan, 2004).



**Figura 6** - Biofilme de *S. aureus* causador de PJI  
(adaptado de Trampuz and Zimmerli, 2005)

A patogênese da infecção de próteses articulares está relacionada com o crescimento de microrganismos em biofilmes, tornando estas infecções difíceis de diagnosticar e erradicar (Figura 7) (Trampuz and Zimmerli, 2005). Os biofilmes crescem lentamente, em um ou mais locais, levando a que os sintomas visíveis da infecção se manifestem mais tardiamente (Costerton et al., 1999).



**Figura 7** - Fotografia intraoperatória de uma articulação infetada (Ehrlich et al., 2005)

A cirurgia de substituição articular tornou-se numa das cirurgias protéticas mais frequentes nas últimas décadas (Bernard et al., 2003; Taylor and Webster, 2009; Trampuz and Zimmerli, 2005), tendo em conta a apreciável melhora relativamente aos

resultados cirúrgicos devido à difusão de técnicas operatórias precisas e ao desenvolvimento de materiais de implante de alta tecnologia (Lima et al., 2004). Deste modo, tornou-se o tratamento de primeira escolha para pacientes com idade superior a 55 anos, com dor severa e incapacidade de mobilização (Widmer, 2001).

No entanto, por ser uma cirurgia de grande porte, ainda se detetam inúmeras complicações pós-operatórias, destacando-se a infecção como sendo a de mais difícil resolução (Lima et al., 2004).

#### i. Incidência

As artroplastias ocorrem numa pequena percentagem de pacientes. No entanto, em termos de ortopedia, 1,5%-2,5% de todas as artroplastias de joelho e anca apresentam tendência para se tornarem infetadas (Taylor and Webster, 2009), resultando em sintomas dolorosos persistentes, necessidade de nova operação, potencial perda do implante com redução da qualidade de vida e, algumas vezes, óbito (Salles, 2008).

Mesmo com os avanços nas medidas de prevenção, diagnóstico e tratamento precoce, o número absoluto de pacientes com infecção associada a próteses articulares deverá aumentar pelo risco prolongado de adesão de microrganismos no implante e pela melhoria nas técnicas de deteção dos agentes infecciosos causadores do biofilme (Salles, 2008).

#### ii. Etiologia

A maioria das infecções pode apresentar três vias de ocorrência: 1) peri-operatória, inicia-se durante o ato cirúrgico através da inoculação direta no implante ou nos tecidos por microrganismos da pele do paciente ou dos profissionais de saúde e também por patógenos suspensos no ar; 2) hematogénica, pela disseminação de patógenos originários da boca, trato respiratório e urinário, pele e tecido subcutâneo ou gastrointestinal, ou por inoculação direta após trauma ou cirurgia; 3) contígua, por reativação de focos quiescentes (pioartrites, osteomielites ou manipulações cirúrgicas prévias) (Tabela 6) (Lima et al., 2004; Salles, 2008; Trampuz and Zimmerli, 2005).

A infecção é tipicamente causada por patógenos capazes de produzir biofilme no implante metálico e/ou cimento ortopédico (Salles, 2008). Dos organismos causadores, a maioria (50 a 60% são bactérias Gram-positivas, 10 a 20% bactérias Gram-negativas, e 10 a 20% envolve infecção mista com predominância de bactérias aeróbias (Lima et al., 2004).

**Tabela 6** - Classificação das infecções associadas a próteses (adaptado de Trampuz and Zimmerli, 2005)

Classificação	Características
<b>De acordo com a via de infecção</b>	
Peri-operatória	Inoculação de microrganismos no interior da ferida cirúrgica durante a cirurgia ou imediatamente após
Hematogénica	Disseminação de um foco de infecção distante através do sangue ou linfa
Contígua	Disseminação contígua através de um foco de infecção adjacente (OM pré-existente, lesões da pele e tecidos, trauma)
<b>De acordo com o início dos sintomas após implante</b>	
Infecção precoce (<3 meses)	Adquirida durante cirurgia de implante ou nos 2-4 dias seguintes, causada por organismos de alta virulência ( <i>S.aureus</i> ou bacilos Gram-negativos)
Infecção tardia ou de baixo grau (3-24 meses)	Adquirida durante cirurgia de implante e causada por organismos menos virulentos ( <i>Staphylococcus</i> CoNS, <i>P.acnes</i> )
Infecção tardia (> 24 meses)	Causada por propagação hematogénica de infecções distantes

### iii. Fatores de risco para infecção

O risco de infecção está associado à condição do hospedeiro, ao ambiente cirúrgico e à cirurgia propriamente dita (Lima et al., 2004).

Relativamente ao hospedeiro, cirurgias anteriores no local da artroplastia, presença de hematoma, necrose ou infecção na ferida operatória, indivíduos imunocomprometidos, portadores de artrite reumatoide, psoríase, portadores de Diabetes Mellitus, desnutridos, obesidade e portadores de sonda vesical, contribuem para aumentar o risco de infecção (Lima et al., 2004; Salles, 2008).

Quanto ao ambiente cirúrgico, é necessário a manutenção do sistema de ar condicionado, utilização de fluxo de ar laminar, esterilização e acondicionamento adequado dos materiais prostéticos, bem como a técnica asséptica (Lima et al., 2004). A cirurgia propriamente dita, contribui para aumentar o risco de infecção quando realizada com técnica inadequada, com tempo cirúrgico prolongado, manipulação excessiva de partes moles e número elevado de pessoas no bloco operatório (Lima et al., 2004).

Zimmerli e col. (*cit. in* Salles, 2008) publicaram um algoritmo de tratamento de artroplastias de anca e joelho infetadas, que tem em consideração os fatores de risco avaliados em estudos anteriores (Figuras 8 e 9) (Salles, 2008).

#### iv. Diagnóstico

A dor é um dos sintomas mais relevantes e mais encontrados nas infecções em artroplastias. Outros sinais e sintomas passíveis de identificação são: nas infecções precoces, dor local, hematoma infetado, calor e edema na ferida operatória, derrame articular, hiperemia, fístula e necrose cutânea; nas infecções demoradas, soltura da prótese, perda precoce da prótese com dor articular persistente e redução da amplitude de movimento, alteração na progressão da reabilitação; nas infecções tardias, sintomas de sepsis (Lima et al., 2004; Salles, 2008).

Entretanto, na evolução do processo de diagnóstico poderão ser realizados estudos de laboratório que englobam exames sanguíneos; estudos histopatológicos; estudos microbiológicos (recolha de amostras pré e intraoperatórias ou recolha do implante ou seus fragmentos); estudos de imagem (radiografia simples, artrografia de contraste, ultrassonografia, medicina nuclear, tomografia computadorizada e ressonância magnética) (Lima et al., 2004; Trampuz and Zimmerli, 2005).

#### v. Tratamento

Estas infecções podem ser classificadas de acordo com o tempo que decorre entre a cirurgia e o aparecimento dos sinais e sintomas de infecção em: precoce (até 3 meses), resultante da contaminação peri-operatória causada por *S. aureus* ou bacilos Gram-negativos; demorada (3 a 24 meses), geralmente causada por microrganismos de baixa virulência inoculados durante a cirurgia como *Staphylococcus* coagulase-negativo ou

*Propionibacterium acnes* e tardia (após 24 meses), geralmente decorrente da disseminação hematogênica de infecções cutâneas, orais, respiratórias ou urinárias por *S. aureus*, *Streptococcus* beta-hemolíticos ou bacilos Gram-negativos (Tabela 6) (Salles, 2008).

O objetivo principal do tratamento é erradicar a infecção mantendo a funcionalidade da articulação e mantendo-a livre de dor. As estratégias de tratamento incluem a manutenção da prótese (antibioticoterapia de supressão e desbridamento do tecido infetado com retenção do implante), troca da prótese (remoção da prótese com troca em tempo único ou em dois tempos) e salvamento (artrodese, artroplastia de ressecção ou amputação) (Tabela 7) (Lima et al., 2004; Salles, 2008).

**Tabela 7** - Métodos de tratamento para ATJ infetadas (adaptado de Lima et al, 2004)

<b>Manutenção da prótese</b>	<b>Troca da prótese</b>	<b>Salvamento</b>
Antibioticoterapia de supressão	Tempo único	Artrodese
Desbridamento cirúrgico	Dois tempos	Artroplastia de ressecção
		Amputação

Fatores importantes que determinam a melhor opção cirúrgica são a condição clínica e a longevidade do paciente que possam permitir mais do que um procedimento cirúrgico em pouco tempo e também o tempo de desenvolvimento da infecção. Infecções precoces e tardias que, geralmente, manifestam sintomas em pouco tempo, têm menor possibilidade de formação de biofilme ou soltura da prótese (Salles, 2008).

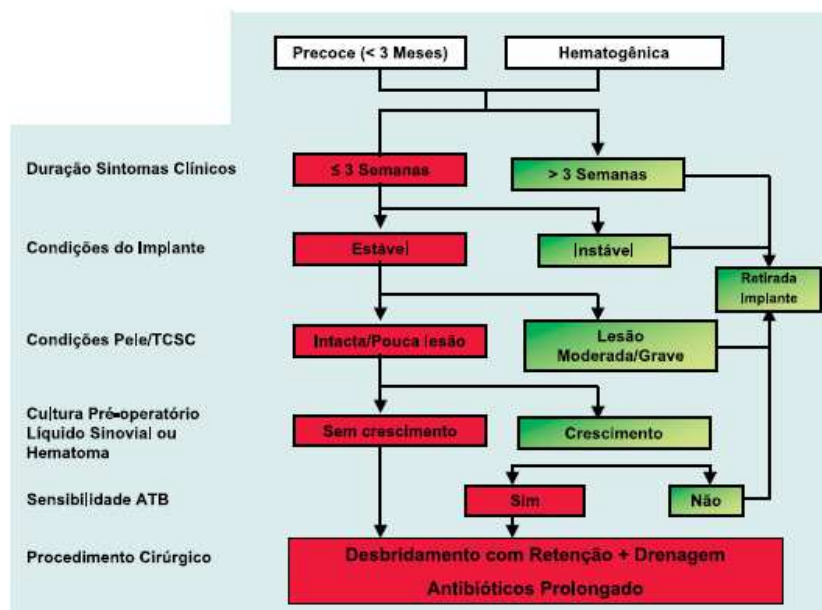
✓ Antibioticoterapia de supressão

A terapêutica antibiótica ideal deve ser bactericida para patogêneos com habilidade de adesão em biomateriais, de crescer lentamente e de formar biofilme. A melhor opção terapêutica para as infecções em próteses ortopédicas leva em consideração vários aspectos incluindo a duração dos sintomas, estabilidade e idade do implante, condições de imunidade e comorbidades do hospedeiro, as condições do parênquima ósseo e do tecido celular subcutâneo e a agressividade e perfil de sensibilidade do patogêneo

(Salles, 2008). Tem como base os resultados da cultura de bactérias e antibiograma mas, apresenta resultados com baixos índices de sucesso (Lima et al., 2004).

✓ Desbridamento cirúrgico

O desbridamento com retenção do implante pode ser uma opção de tratamento, com taxas de sucesso maiores que 70%, para infecções de anca e joelho em pacientes com infecção precoce e tardia, se determinadas condições forem preenchidas (duração de sinais e sintomas de infecção inferior a três semanas; estabilidade da prótese; boas condições da pele e tecido subcutâneo; patógeno suscetível a agentes antimicrobianos ativos contra microrganismos em biofilmes). O tratamento com antibiótico endovenoso deve ser mantido por 2-4 semanas seguido de terapia oral durante 3-6 meses para artroplastia de anca e joelho, respectivamente (Figura 8) (Lima et al., 2004; Salles, 2008; Trampuz and Zimmerli, 2005).



**Figura 8** - Algoritmo de tratamento de artroplastias infetadas (adaptado de Salles, 2008)

✓ Remoção da prótese com troca em tempo único

Na Europa, o procedimento cirúrgico mais frequentemente utilizado é a troca da prótese infectada em tempo único, sendo precedida de adequada avaliação dos fatores de risco responsáveis pela falência do tratamento tais como o tipo de infecção (precoce, demorada ou tardia), a duração da infecção, a estabilidade do implante, o microrganismo envolvido na infecção e a qualidade da pele e tecido subcutâneo. Quando bem selecionados e avaliados, estes pacientes apresentam altas taxas de cura a longo prazo e vantagens como: menor tempo de imobilidade, redução dos custos e de morbidades relacionadas com os procedimentos cirúrgicos (Salles, 2008).

Este procedimento inclui a remoção da prótese e introdução de uma nova, durante o mesmo procedimento cirúrgico. É uma abordagem adequada a pacientes com tecidos moles intactos ou apenas ligeiramente comprometidos e tem uma taxa de sucesso de 86 a 100% em pacientes selecionados corretamente (Trampuz and Zimmerli, 2005).

Se a infecção estiver a ser causada por microrganismos resistentes ou difíceis de tratar como (MRSA, *Pseudomonas aeruginosa* resistente às quinolonas, *Enterococcus*, pequenas colónias variantes de *Staphylococcus* ou fungos) é preferível a troca em dois tempos (Trampuz and Zimmerli, 2005).

✓ Remoção da prótese com troca em dois tempos

A terapia mais comumente usada para infecção de prótese comum é a troca de prótese em dois tempos separados por 6 semanas de antibioticoterapia intravenosa. Isso resulta muitas vezes em longos períodos de hospitalização, comprometimento funcional grave, morbidade e, por vezes, aumento da mortalidade (Bernard et al., 2003).

Esta técnica envolve a remoção da prótese e ressecção de todo o tecido infectado e baseia-se na remoção do implante seguida da colocação de um espaçador impregnado com antibiótico, seguida de um segundo tempo cirúrgico para a colocação de uma prótese definitiva, sempre acompanhado de terapia com antibiótico por um período prolongado de tempo (4 a 6 meses) (Lima et al. 2004; Salles, 2008). A colocação do espaçador com antibiótico como primeiro passo no tratamento da infecção, está relacionado com a libertação local de antibiótico e com a ocupação do espaço morto intra-articular,

impedindo a formação de um hematoma que é um ambiente favorável para a proliferação e perpetuação da infecção (Lima et al., 2004).

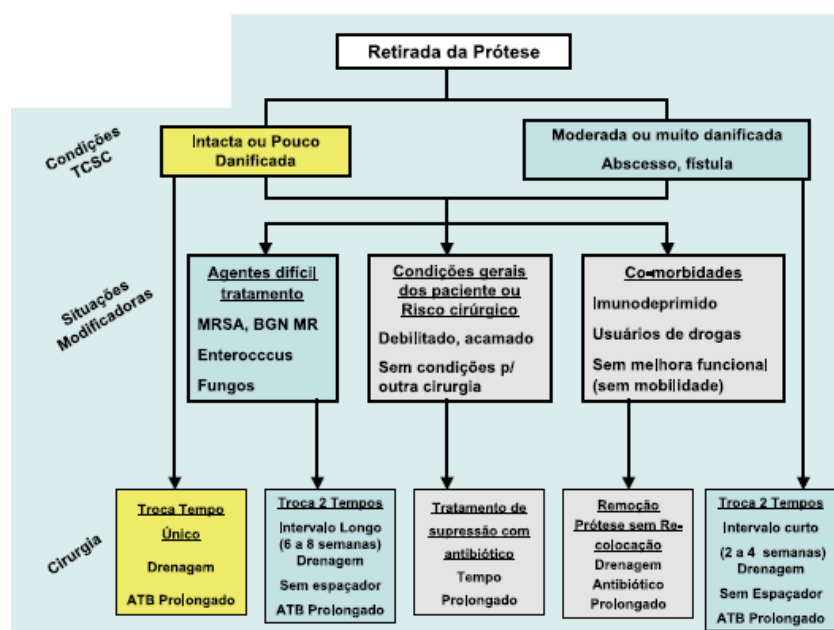
Os pré-requisitos para este método de tratamento incluem: massa óssea adequada e nível mínimo de comorbidades, de modo a permitir vários procedimentos cirúrgicos (Bernard et al., 2003).

Se não forem isolados microrganismos difíceis de tratar, deve ser usado um curto intervalo de tempo até nova reimplantação (2-4 semanas) e deverá ser usado um espaçador de cimento impregnado com antibiótico (Trampuz and Zimmerli, 2005).

Se forem isolados microrganismos difíceis de tratar, deverá ser usado um intervalo de tempo maior (8 semanas) sem espaçador. Este procedimento é o que apresenta maior taxa de sucesso (maior que 90%), no entanto, os custos para o paciente são mais elevados do que para outras opções cirúrgicas (Trampuz and Zimmerli, 2005).

#### ✓ Artrodese

A remoção permanente do implante ou artrodese é geralmente indicada para pacientes imunocomprometidos graves, usuários de drogas endovenosas e àqueles que não é esperada melhoria funcional após cirurgia. Como alternativa, pode ser usada a antibioticoterapia, indicada para pacientes sem possibilidades clínicas de realizar cirurgias ou se recusam outro procedimento cirúrgico (Figura 9) (Salles, 2008; Trampuz and Zimmerli, 2005). Esta opção apenas controla os sintomas, não erradica a infecção, podendo ocorrer recidivas em 80% dos pacientes caso a terapia antimicrobiana seja interrompida (Bernard et al., 2003; Trampuz and Zimmerli, 2005).



**Figura 9** - Algoritmo de tratamento de artroplastias infetadas (adaptado de Salles, 2008)

✓ Artroplastia de recessão

Nesta forma de tratamento retira-se a articulação, deixando um espaço que será preenchido por tecido fibroso, conferindo alguma estabilidade articular. É necessário o uso de órtese, apoio ou dispositivo externo aplicado ao membro inferior para modificar os aspetos funcionais ou estruturais do sistema neuromusculoesquelético (Trampuz and Zimmerli, 2005).

✓ Amputação

Utilizada somente em casos dramáticos, nos quais o quadro infeccioso põe em risco a vida do paciente (Lima et al., 2004).

✓ Terapia antimicrobiana

O tratamento intravenoso deve ser administrado para as primeiras 2-4 semanas, seguido de terapia oral para completar o ciclo de tratamento (Trampuz and Zimmerli, 2005). O

tratamento sugerido tem a duração de 3 meses para próteses de anca e 6 meses para próteses de joelho (Trampuz and Zimmerli, 2005).

Terapêutica antimicrobiana deve ser sempre combinada com a cirurgia. A principal dificuldade na análise da eficácia da antibioticoterapia para o tratamento de infecções de prótese articular está em saber exatamente que tipo de procedimento cirúrgico foi realizado. Outro fator é a heterogeneidade e pequeno número de casos de infecções em próteses articulares incluídos nos estudos de terapia antimicrobiana. Acredita-se que a terapia combinada é mais eficaz na prevenção do insucesso do tratamento secundário para o aparecimento de organismos resistentes (Bernard et al., 2003).

A terapia ideal para infecções estafilocócicas inclui a rifampicina que apresenta uma excelente actividade sobre o lento crescimento e sobre *Staphylococcus* aderentes. Deve ser combinada com outro antibiótico de modo a evitar desenvolvimento de resistências, sendo as quinolonas excelentes pela sua boa biodisponibilidade, actividade e segurança (Trampuz and Zimmerli, 2005). Contudo, devido à crescente resistência às quinolonas, outros antibióticos foram testados e combinados com rifampicina como o cotrimoxazol, minociclina ou ácido fusídico (Trampuz and Zimmerli, 2005).

É extremamente importante que, em conjunto com os cirurgiões ortopédicos, os infectologistas avaliem os pacientes na fase pré-operatória estabelecendo e controlando os fatores de risco para infecções, e nas fases peri e pós-operatória, determinem a terapêutica com antibióticos mais adequada e monitorizem os riscos de eventos adversos e indução de resistência (Salles, 2008).

## **2. Osteomielite**

A osteomielite (OM) é definida como uma infecção do osso, causada por um organismo piogénico. Pode ser caracterizada como aguda, subaguda e crónica, quando baseadas na duração da infecção (Carek et al., 2001). A sua patogenia tem sido explorada clinicamente e, diferentes tipos de osteomielite podem ser classificados de acordo com a fonte de infecção e a capacidade vascular do hospedeiro (Brady et al., 2008), dividindo-se em: hematogénica, contígua e crónica (Carek et al., 2001).

Normalmente, o osso é relativamente resistente à infecção, contudo, a OM pode ocorrer se houver uma grande inoculação de organismos; ocorrência de trauma, resultando em lesão óssea; presença de corpos estranhos (implantes prostéticos); ou invasão do osso por uma espécie bacteriana particularmente virulenta (*Staphylococcus aureus*). Como tal, a ocorrência, tipo, gravidade e prognóstico clínico desta patologia, dependem de um conjunto de fatores que englobam as características e virulência do patógeno infetante, as propriedades do hospedeiro e a fonte de infecção (Brady et al., 2006).

Após colonização do osso e desenvolvimento de infecção aguda podem ocorrer três situações possíveis: 1) a infecção pode ser resolvida; 2) pode tornar-se assintomática e duradoura; ou 3) pode tornar-se uma infecção crônica com deterioração óssea progressiva e extensão da infecção (Brady et al., 2006).

A OM hematogénica é causada pela propagação de bactérias na corrente sanguínea e é responsável por 20% dos casos (Brady et al., 2008). Pode ser subdividida em categorias, primária e secundária (Brady et al., 2006).

A OM hematogénica primária é causada, pela inoculação de bactérias circulantes na corrente sanguínea, no osso. Embora também encontrada na população adulta, é mais comum em bebés e crianças, com 85% dos casos (Brady et al., 2006). A OM hematogénica, em adultos, é causada por infecção secundária, a partir de um local distal da infecção. O local mais comum de desenvolvimento é a parte distal da tíbia e a lesão é, geralmente, única e localizada perto da metáfise de ossos longos (Brady et al., 2008; Carek et al., 2001). Existem dois tipos de OM hematogénica: vertebral e em ossos longos (Brady et al., 2006; Brady et al., 2008).

Nos últimos anos, tem-se verificado um declínio no aparecimento de OM hematogénica com aumento, em simultâneo, da osteomielite de foco contíguo (Brady et al., 2008). O termo “foco contíguo” implica que a infecção provenha de uma infecção dos tecidos moles adjacentes. No entanto, a OM crónica de foco contíguo pode também ter origem numa infecção aguda, onde os microrganismos são inoculados diretamente no osso no momento do trauma. A infecção também pode ser disseminada por contaminação hospitalar durante procedimentos pré ou intraoperatórios (Brady et al., 2008).

A OM crônica resulta, comumente, numa anormal remodelação óssea e num comprometimento vascular na área infetada. A sua cura pode requerer uma extensiva reconstrução óssea e dos tecidos moles (Ellington et al., 2006).

Uma vez instalada infecção crônica, nem o sistema imune do hospedeiro, nem a terapêutica antimicrobiana conseguem combater. Neste ponto, só com remoção cirúrgica do foco de infecção se consegue completa resolução (Brady et al., 2006).

Uma vez que o tratamento cirúrgico pode afetar, severamente, a qualidade de vida, os pacientes optam muitas vezes por suprimir a recorrência através da terapêutica com antibióticos a longo prazo (Ellington et al., 2006).

A maioria dos casos de OM está associada a perda óssea e comprometimento dos tecidos moles. No entanto, com os avanços da tecnologia de implante, a OM tornou-se uma complicação séria e não rara, de cirurgia reconstrutiva ortopédica (Ellington et al., 2006).

i. Espécies microbianas responsáveis pela OM

A osteomielite hematogénica é, geralmente, monomicrobiana, ou seja, uma única espécie bacteriana é isolada da região que se encontra infetada. A existência de mais do que uma espécie microbiana na mesma região é um acontecimento raro neste tipo de osteomielite (Brady et al., 2008).

Em lactentes, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* e *Escherichia coli* são as espécies bacterianas mais frequentemente recuperadas enquanto que, em crianças, os mais frequentemente isolados são *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* e *Haemophilus influenzae* (Brady et al., 2008).

Em adultos, *Staphylococcus aureus* é o organismo mais comumente isolado que produz a maioria das infecções associadas à OM, em todas as faixas etárias (Brady et al., 2008). No entanto, destacam-se ainda outros agentes patogénicos associados à osteomielite, *Enterococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter spp.*, *Mycobacterium spp.*, assim como espécies anaeróbias e fúngicas,

especificamente *Candida spp.* Cada uma destas espécies representa, individualmente, uma pequena minoria das infecções (Brady et al., 2008).

A principal causa da ocorrência de infecção inicial e desenvolvimento de infecção persistente e crônica, deve-se ao estado imunológico do hospedeiro se encontrar comprometido (Brady et al., 2008).

Na OM vertebral são encontrados, por vezes, bacilos Gram-negativos aeróbios originários do trato urinário ou do uso de drogas injetáveis como fonte de infecção (*P. aeruginosa* e *Serratia marcescens* apresentam elevada incidência em consumidores de drogas injetáveis) (Brady et al., 2008).

Em indivíduos com pé diabético, são frequentemente encontrados organismos como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus spp.* coagulase-negativo, *Streptococcus spp.*, *Enterococcus spp.*, bacilos gram-negativo e anaeróbios (Brady et al., 2008).

A OM vertebral no seguimento de um foco contíguo é geralmente uma infecção polimicrobiana na qual anaeróbios são muitas vezes isolados (Brady et al., 2008).

Em contraste com a OM hematogénica, nos casos de OM de foco contíguo, são múltiplas as espécies patogénicas geralmente isoladas do osso infetado, sendo *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus* coagulase-negativo as que contribuem para a maioria dos casos (75%). No entanto, bacilos Gram-negativo e anaeróbios são também isolados (Brady et al., 2008).

## ii. Diagnóstico

O diagnóstico da OM pode ser bastante difícil. Existem vários métodos de imagem que permitem a visualização do local provável de infecção, por parte dos clínicos especializados (Brady et al., 2006).

A radiografia convencional é um dos métodos mais utilizados, principalmente no diagnóstico de OM crónica mas, no entanto, alterações radiográficas no osso são difíceis de interpretar e pode demorar até duas semanas após início da infecção, para atingir a perda de 30 a 50% da densidade óssea, que é muitas vezes necessária para a visualização (Brady et al., 2006). No caso de infecção aguda, a ressonância magnética

(MRI) é eficaz no diagnóstico, quando não associadas a implantes metálicos (Brady et al., 2008).

O Ultrassom é outra opção apesar de só ser capaz de diagnosticar a infecção do tecido mole em redor do osso, tornando-se uma técnica não eficaz no diagnóstico da OM (Brady et al., 2006).

A tomografia computadorizada pode ser uma técnica de recurso devido ao elevado nível de detalhe que proporciona, particularmente em casos de OM vertebral. No entanto, devido a problemas de dispersão aquando a presença de implantes metálicos, este método nem sempre é útil no caso de implantes infetados. É também uma técnica que exige elevado custo, o que limita ainda mais a sua utilidade (Brady et al., 2006).

Os radionuclídeos são bastante usados quando se pretender identificar áreas de inflamação, com a vantagem de serem úteis em suspeitas de infecções associadas a implantes, tendo em conta que não existe o problema da dispersão (Brady et al., 2006).

A chave para um bom diagnóstico é a realização de uma biopsia ao tecido infetado para obtenção de uma amostra e, posteriormente, cultivá-la para o organismo infetante, de modo a determinar se há presença de OM (Brady et al., 2006).

### iii. Tratamento

Relativamente ao tratamento, é desejável conter a infecção de modo a preservar a integridade funcional do membro afetado (Brady et al., 2008).

Durante a infecção aguda, se o tratamento for iniciado precocemente com o antibiótico adequado, a infecção acaba por desaparecer após 2 a 4 semanas de tratamento. No entanto, estas infecções são difíceis de detetar precocemente (Brady et al., 2008).

A presença de um implante aumenta a probabilidade de OM, e a remoção cirúrgica do implante e tecido ósseo contaminado, pode ser indispensável para a sua erradicação completa, seguida de longos períodos com terapêutica antimicrobiana (Brady et al., 2008; Ellington et al., 2006).

Sendo os *Staphylococcus* os agentes patogênicos mais comuns a causar OM, é aconselhável começar uma terapia com agentes antiestafilocócicos. O tratamento dura, aproximadamente, quatro semanas e é administrado via intravenosa. Em adultos, infecções por *Staphylococcus aureus* são geralmente tratadas com penicilina, para MSSA (*Staphylococcus aureus* sensíveis à meticilina) ou nafcilina, para MRSA (*Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina); e também com cefazolina; clindamicina; vancomicina; ciprofloxacina ou levofloxacina como alternativas (Brady et al., 2008).

## **V. Novas estratégias usadas no tratamento e prevenção da formação de infecções associadas a biofilmes**

Atualmente, não existe nenhuma técnica eficaz e não invasiva para tratar infecções associadas a biofilmes em implantes médicos. Os esforços para desenvolver um tratamento não-invasivo e eficaz para este tipo de infecções incluem reforço elétrico e ultrassônico de antibióticos e uso de antibióticos aplicados em biomateriais (Carmen et al., 2005).

Na prática clínica, embora a inflamação desapareça após administração de agentes antimicrobianos e a infecção aparente estar resolvida, poderão haver recaídas após algum tempo. Nestes casos, poderá significar que apenas as bactérias planctônicas tenham sido eliminadas durante a fase inicial de desaparecimento dos sintomas. Os biofilmes podem assim permanecer intactos e voltar a libertar bactérias, causando infecção e reativando os sintomas. Para conseguir uma cura completa, terá de ser seguida uma estratégia para impedir a presença e formação de biofilmes (Nishimura et al., 2006).

Sofisticadas estratégias de prevenção têm sido desenvolvidas durante as últimas duas décadas para diminuir o risco de complicações infecciosas em cirurgias de implante. Exemplos incluem o fluxo de ar laminar, a profilaxia antimicrobiana de rotina, tempo de operação curto, uso de cimento ósseo impregnado de antibiótico e revestimento antimicrobiano (Widmer, 2001).

Uma vez que a resistência do biofilme depende de agregação de bactérias em comunidades multicelulares, uma estratégia pode ser o desenvolvimento de terapias que perturbam a estrutura multicelular do biofilme. Se a estrutura é alterada, as defesas do hospedeiro podem ser capazes de resolver a infecção, passando os antibióticos a ter alguma eficácia (Stewart and Costerton, 2001).

Potenciais novas terapias incluem enzimas que dissolvem os polímeros da matriz do biofilme, reações químicas que bloqueiam a síntese da matriz do biofilme, e análogos de moléculas sinalizadoras microbianas que interferem com a comunicação entre células, necessária para a formação normal do biofilme (Stewart and Costerton, 2001).

Outra possibilidade para a eliminação do biofilme surgiu com a observação da autodestruição do biofilme. Como o oxigênio fica empobrecido pelo crescimento da massa de biofilme, uma liase exopolissacarídica específica é induzida para digerir a matriz do biofilme, originando a libertação das células. A combinação de hidrólise de polissacarídeos, enzimas e oxidorreduções causa tanto a remoção como a inativação do biofilme bacteriano (Prakash et al., 2003).

### **1. Interferência com a sinalização interbacteriana para a formação de biofilmes**

A formação de um biofilme pode ser bloqueada por inibidores *quorum sensing* (QSI). Durante o estágio de maturação do biofilme, uma ruptura dos sistemas de comunicação célula-célula para regular a expressão dos genes necessários e/ou ativamente envolvidos na formação do biofilme pode manter as células no seu estado planctônico (Chen and Wen, 2011).

Como diversas publicações sugerem que os sistemas de *QS* estão implicitamente envolvidos no controle da formação de biofilmes e infecções associadas, inúmeros pesquisadores estão focados em desenvolver potenciais novas terapêuticas usando os QSI para impedir os processos de adesão que são mediados por pili e flagelos ou os sistemas de comunicação celular envolvidos no desenvolvimento do biofilme (Chen and Wen, 2011; Prakash et al., 2003).

### **2. Abordagens químicas para a eliminação de biofilmes**

A interferência com a adesão de microrganismos a substratos sólidos, que é o primeiro passo essencial da colonização, é uma estratégia que tem sido usada há já algum tempo na luta contra a formação de biofilmes microbianos (Dror et al., 2009).

As modificações químicas constituem a principal estratégia atualmente implementada para a eliminação de biofilmes em dispositivos médicos de longa permanência. Neste caso, os dispositivos são cobertos com agentes antimicrobianos (antibióticos, biocidas),

formando uma superfície única capaz de matar/eliminar as bactérias apenas pelo contacto (*contact-killing surfaces*) e cujos biomateriais que a constituem são incompatíveis com a adesão (Dror et al., 2009).

No entanto, um dos fatores que contribui para o fracasso total destas abordagens químicas para prevenção da formação de biofilmes em dispositivos médicos é o aumento da resistência das bactérias aos agentes antimicrobianos (Dror et al., 2009).

### **3. Abordagens biológicas para erradicação de biofilmes bacterianos**

Uma nova e interessante abordagem que surgiu recentemente centra-se no tratamento dos biofilmes com bacteriófagos líticos. O elemento atrativo neste conceito é a descoberta de enzimas produzidas pelos fagos, capazes de degradar componentes da matriz do biofilme, permitindo-lhes depois penetrar as camadas internas do biofilme, infetar as bactérias e provocar a sua lise (Dror et al., 2009).

### **4. Usos da energia acústica na prevenção de biofilmes**

A incapacidade de erradicar biofilmes microbianos por meios químicos aumenta a perspectiva de que as estratégias mecânicas podem produzir melhores resultados. Uma das abordagens mecânicas defendidas tem sido o uso de energia acústica para evitar a formação de biofilmes, bem como para interromper a integridade dos já existentes (Dror et al., 2009).

Energia acústica ultrassónica está a ser investigada como um meio para interromper o mecanismo de sinalização *quorum sensing* através da indução de caos nos gradientes de concentração. O objetivo é evitar a migração de células bacterianas e a sua agregação/concentração em locais de formação de colónias, interferindo desta forma com a diferenciação do biofilme (Dror et al., 2009).

A utilização da técnica de ultrassons para melhorar a atividade de antibióticos é bastante promissora por várias razões. Em primeiro lugar, é usada em várias aplicações, sendo

bem aceite e apresentando poucos ou nenhuns efeitos secundários. Em segundo lugar, permite um tratamento não-invasivo das superfícies colonizadas por biofilmes. Por último, permite um direcionamento do tratamento para uma região específica (Carmen et al., 2005).

O reforço da ação de antibióticos através de ultrassons tem-se mostrado uma técnica promissora *in vivo*, contra organismos encontrados frequentemente em infecções associadas a implantes. A título de exemplo, Carmen et al. (2005) citam que, em biofilmes Gram-positivos de *Staphylococcus epidermidis*, a aplicação de ultrassons durante terapia com vancomicina diminuiu ainda mais a viabilidade do próprio biofilme *in vivo*. A mesma terapia também funcionou em biofilmes Gram-negativos de *Escherichia coli* (Carmen et al., 2005).

Ultrassom pode melhorar o transporte de oxigénio e nutrientes para as células dentro de biofilmes e para células planctónicas, resultando na aceleração das taxas metabólicas das células, tornando as células mais suscetíveis aos antibióticos (Dror et al., 2009).

Combinações de ultrassom pulsado com um antibiótico libertado lentamente de cimentos ósseos (pré-carregado com antibióticos) foram descobertos como sendo potenciais redutores da viabilidade de bactérias, tanto planctónicas como presentes em biofilmes, em comparação com antibióticos administrados na ausência de energia acústica (Dror et al., 2009).

## **5. Abordagem de engenharia para evitar artroplastias infetadas**

Ehrlich et al., organizaram uma abordagem multidisciplinar de engenharia biomédica para desenvolver um “implante inteligente”, que apresenta a capacidade de autodiagnóstico, autotratamento e automonitorização para combater o problema devastador de infecções bacterianas pós-implantação que se formam nas próteses articulares artificiais (Ehrlich et al., 2005).

O conceito geral baseia-se na produção de uma artroplastia que contém um dispositivo de biosensoriamento do tipo MEMS, que pode perceber sistemas de comunicação

bacteriana associados com autoindução, *quorum sensing*, e formação de biofilme (Ehrlich et al., 2005).

Na intercetação de sinais de bacterianos, o biossensor MEMS iria permitir: 1) libertação de compostos inibitórios que vão impedir a formação de biofilmes e 2) libertação de antibióticos em concentrações muito elevadas a nível local que vão erradicar todas as bactérias planctónicas que estão em proximidade com a articulação antes de estabelecer um biofilme. Portanto, não só esta estratégia poderia prever níveis mais elevados de dosagem de antibióticos sistemicamente tolerados, como também poderia aumentar o tamanho da farmacopeia disponível - uma vantagem considerável considerando a alta percentagem de espécies patogénicas que adquirem resistências (Ehrlich et al., 2005).

Os biossensores MEMS e os reservatórios de drogas estariam ligados a um sistema de telemetria incorporado nas próteses, tornando-se assim acessíveis para o paciente e médico, utilizando um dispositivo *bluetooth* de monitorização portátil, que por sua vez seria capaz de se comunicar com a *web* sem fio. Portanto, os pacientes seriam capazes de fazer uma leitura em qualquer lugar do mundo e fazer o *upload* dos dados para a internet, a partir do qual o médico poderia acompanhar o estado da articulação, independentemente da localização (Ehrlich et al., 2005)

Os implantes inteligentes podem: 1) monitorizar continuamente locais do implante para a presença de bactérias, 2) libertar várias substâncias antimicrobianas na deteção de bactérias; 3) monitorizar a libertação de agentes antimicrobianos e 4) fornecer um relatório de todas as deteções de bactérias e tratamentos através de telemetria para o paciente e médico (Ehrlich et al., 2005).

## **6. Uso de nanopartículas para prevenção de biofilmes em próteses**

A nanotecnologia poderá fornecer a resposta para penetrar nos biofilmes e reduzir a formação de biofilmes, e poderá estar envolvida na promoção do crescimento de tecidos (Taylor and Webster, 2009). As nanopartículas são pequenas o suficiente para penetrar no biofilme, grandes o suficiente para terem um longo tempo de semivida e,

adicionalmente, oferecem uma superfície para transporte de antibióticos (Taylor and Webster, 2009).

Estudos anteriores indicaram que nanopartículas de óxido de ferro superparamagnético ( $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) (SPION) promoveram funções metabólicas dos osteoblastos, quando adicionados ao meio de cultura celular. Além disso, após revestimento dessas nanopartículas com fosfato de cálcio (componente natural do osso), um novo aumento das funções dos osteoblastos foi observado (Taylor and Webster, 2009).

Nanopartículas de ferro podem oferecer alguns benefícios adicionais para o tratamento do biofilme. Restrição de ferro está intimamente relacionada com o início fisiológico da formação do biofilme de bactérias patogênicas comuns como *Staphylococcus epidermidis*, *S. aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Nanopartículas superparamagnéticas são atraentes para este fim, porque a entrega de antibióticos pode ser realizada na presença de um campo magnético (Taylor and Webster, 2009).

A proposta deste novo estudo realizado, é que as partículas de óxido de ferro magnético, por si só ou em conjunto com outros agentes terapêuticos, possam evitar a formação de biofilmes em próteses ortopédicas através da ligação à membrana celular ou às proteínas da membrana celular através de ligações electroestáticas, causando disrupção de colônias de bactérias ou causando diminuição da infecção instalada na prótese. SPION pode também funcionar como agente de contraste que permite o diagnóstico de infecção (Taylor and Webster, 2009).

No entanto, apesar das nanopartículas poderem fornecer meios efetivos para o tratamento de biofilmes em implantes ortopédicos, mais trabalho é necessário para elucidar completamente e desenvolver novas estratégias terapêuticas (Stewart and Costerton, 2001).

## **CONCLUSÃO**

A maior parte da atividade bacteriana na natureza surge da decorrência de comunidades bacterianas organizadas em forma de biofilmes. Esta associação de organismos constitui uma forma de proteção ao seu desenvolvimento, favorecendo interações sinérgicas e permitindo a sobrevivência em ambientes hostis.

No Homem, a variedade de infecções bacterianas crônicas que envolve biofilmes é bastante significativa, podendo estas ser causadas por uma única ou mais espécies. Através de técnicas microscópicas, tem sido possível observar a grande heterogeneidade dos biofilmes, em que coexistem células em diferentes estados fisiológicos, e que constitui uma importante estratégia de sobrevivência.

Numa perspectiva médica, a formação de um biofilme representa um papel significativo no aparecimento de doenças infecciosas. A extrema capacidade de resistência dos biofilmes aos mecanismos de defesas do hospedeiro ou mesmo à terapia antimicrobiana, torna-se a principal problemática para pessoas que necessitam de dispositivos médicos de longa permanência.

São inúmeras as infecções humanas associadas a biofilmes e os mecanismos pelos quais os biofilmes são capazes de causar infecção. Embora estes mecanismos já sejam estudados há mais de 25 anos, continua a haver uma falha quanto à informação sobre a estrutura e atividade fisiológica dos agentes no interior do biofilme. No seu interior, a microbiota não é afetada pelos mecanismos de defesa do hospedeiro nem pela ação dos agentes antimicrobianos, em decorrência da proteção conferida pela camada superficial polissacarídica e da redução do metabolismo dos microrganismos que, frequentemente, se encontram em fase estacionária de crescimento (Salles, 2008).

Infeções relacionadas com implantes desenvolvem-se mesmo aquando controlo e realização de todos os procedimentos de limpeza e desinfeção antes e após cirurgia por pessoal especializado. As principais infecções ortopédicas associadas à formação de biofilmes são as infecções de próteses articulares (PJI) e a osteomielite.

Nas PJI, os organismos Gram-positivos são responsáveis pela maioria das infecções do osso e articulações, destacando-se *S. epidermidis* e *S. aureus*. O agente etiológico Gram-negativo mais frequente, associado a infecções de implantes ortopédicos é a *Pseudomonas aeruginosa*. Relativamente à osteomielite, *Staphylococcus* são os agentes patogênicos mais comuns, provavelmente devido à sua ampla gama de fatores de virulência.

As infecções são marcadas por sintomas que tipicamente são recorrentes mesmo após tratamentos repetidos com antibióticos. A terapia *standard* com antibióticos apenas elimina as bactérias planctônicas, deixando as formas sésseis livres para continuarem a disseminação dentro do biofilme após término da terapia (Davey and O'Toole, 2000).

Sendo assim, a infecção é considerada a mais devastadora das complicações, pois acarreta elevada morbidade devido a internamento prolongado, intervenções cirúrgicas repetidas, podendo culminar na perda definitiva do implante com encurtamento do membro afetado, deformidades graves e permanentes, bem como levar ao óbito no caso de infecções fulminantes.

O objetivo principal do tratamento é erradicar a infecção mantendo a funcionalidade da articulação e mantendo-a livre de dor. As estratégias de tratamento são várias e são escolhidas de acordo com o estágio da infecção e características associadas ao paciente.

Até ao momento, a maioria das infecções vem sendo tratada eficientemente com antibióticos, porém, o número de mecanismos de resistências adquirido é cada vez maior. A escolha inicial do antibiótico mais adequado ao tratamento depende inevitavelmente do patógeno causador da infecção e do seu padrão de sensibilidade. O sucesso do tratamento deste tipo de infecções depende, a longo prazo, da terapia com elevadas doses de antibióticos e da remoção de qualquer objeto estranho ao organismo.

A infecção deve ser detetada o mais precocemente possível para que o tratamento seja eficaz e o menos devastador possível. A seleção dos pacientes deve ser rigorosa e criteriosa bem como a escolha do antibiótico e do procedimento cirúrgico complementar. A duração da infecção é um parâmetro essencial na determinação do tratamento ideal. O sucesso do tratamento de uma prótese infetada procura a melhor

estratégia cirúrgica associada a uma terapia antimicrobiana ideal a longo prazo, predestinada para cada paciente.

Atualmente, não existe nenhuma técnica eficaz e não invasiva para tratar infecções associadas a biofilmes em implantes médicos. Os esforços para reavaliar outras técnicas cirúrgicas e novos conceitos na terapia antimicrobiana, bem como para desenvolver um tratamento não-invasivo e eficaz para este tipo de infecções incluem várias estratégias, como por exemplo o uso de antibióticos aplicados em biomateriais.

## **BIBLIOGRAFIA**

Adachi, K.; Tsurumoto, T.; Yonekura, A.; Nishimura, S.; Kajiyama, S.; Hirakata, Y. and Shindo, H. (2007). New quantitative image analysis of staphylococcal biofilms on the surfaces of nontranslucent metallic biomaterials. *Journal of Orthopaedic Science*, 12, pp.178-184.

Bahna, P.; Dvorak, T.; Hanna, H.; Yasko, A.W.; Hachen, R.; Raad, I. (2007). Orthopaedic metal devices coated with a novel antiseptic dye for the prevention of bacterial biofilms, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 29, pp.593-596.

Behlau, I. and Gilmore, M.S. (2010). Microbial Biofilms in Ophthalmology and Infectious Disease. *Archives of Ophthalmology*, 126(11), pp. 1572-1581.

Bernard, L.; Hoffmeyer, P.; Assal, M.; Vaudaux, P.; Schrenzel, J. and Lew, D. (2003). Trends in the treatment of orthopaedic prosthetic infections, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Volume 53(2), pp.127-129.

Bertucci, F.N., Tedrus, G.M.A.S. (2010). Infecções em próteses ortopédicas: revisão da literatura, *Anais do XV Encontro de Iniciação Científica da PUC-Campinas*.

Brady, R.A.; Leid, J.G.; Calhoun, J.H.; Costerton, J.W. and Shirtliff, M.E. (2008). Osteomyelitis and the role of biofilms in chronic infections. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 52, pp.13-22.

Brady, R.A.; Leid, J.G.; Costerton, J.W. and Shirtliff, M.E. (2006). Osteomyelitis: Clinical Overview and Mechanisms of infection persistence, *Clinical Microbiology Newsletter*, 28(9), pp. 65-72.

Bollinger, N.; Hassett, D.J.; Iglewski, B.H.; Costertons, J.W. and McDermott, T.R. (2001). Gene Expression in *Pseudomonas aeruginosa*: Evidence of Iron Override Effects on Quorum Sensing and Biofilm-specific Gene Regulation, *Journal of Bacteriology*, 183(6), pp. 1990-1996.

Carek, P.J.; Dickerson, L.M. and Sack, J.L. (2001). Diagnosis and management of Osteomyelitis, *American Family Physician*, 63(12), pp. 2413-2420.

Carmen, J.C.; Roeder, B.L.; Nelson, J.L.; Robison Ogilvie, R.L.; Robison, R.A.; Schaalje, G.B. and Pitt, W.G. (2005). Treatment of Biofilm Infections on Implants with Low-frequency Ultrasound and Antibiotics. *American Journal of Infection Control*, 33(2), pp. 78-82.

- Chen, L. and Wen, Y. (2011). The role of bacterial biofilm in persistent infections and control strategies, *International Journal of Oral Science*, 3, pp. 66-73.
- Costerton, J.W. (1995). Overview of microbial biofilms. *Journal of Industrial Microbiology*, 15, pp. 137-140.
- Costerton, J.W. (1999). Introduction to biofilm. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 11, pp. 217-221.
- Costerton, J.W.; Lewandowski, Z.; DeBeer, D.; Caldwell, D.; Korber, D. and James, G. (1994). Biofilms, the Customized Microniche. *Journal of Bacteriology*, 176(8), pp. 2137-2142.
- Costerton, J.W., Stewart, P.S. and Greenberg, E.P. (1999). Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. *Science*, 284, pp. 1318-1322.
- Darley, E.S.R. and MacGowan, A.P. (2004). Antibiotic treatment of Gram-positive bone and joint infections, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53(6), pp.928-935.
- Davey, M.E. and O'Toole, G.A. (2000). Microbial Biofilms: from ecology to Molecular Genetics. *American Society for Microbiology*, 64(4), pp. 847-867.
- Donlan, R.M. (2001). Biofilms and Device-Associated Infections. *Emerging Infectious Disease Journal*, 7(2), pp.277-280.
- Donlan, R.M. (2002). Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerging Infectious Disease Journal*, 8(9), pp.881-888.
- Donlan, R.M. and Costerton, J.W. (2002). Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *American Society for Microbiology*, 15(2), pp. 167-193.
- Dror, N.; Mandel, M.; Hazan, Z. and Lavie, G. (2009). Advances in Microbial Biofilm Prevention on Indwelling Medical Devices with Emphasis on Usage of Acoustic Energy, *Sensors*, 9, pp. 2538-2554.
- Ehrlich, G.D.; Stoodley, P.; Kathju, S.; Zhao, Y.; McLeod, B.R.; Balaban, N.; Ze Hu, F.; Sotereanos, N.G.; Costerton, J.W.; Stewart, P.S.; Post, J.C. and Lin, Q. (2005). Engineering Approaches for the Detection and Control of Orthopaedic Biofilm Infections, *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 437, pp. 59-66.
- Ellington, J.K.; Harris, M.; Hudson, M.C.; Vishin, S.; Webb, L.X. and Sherertz, R. (2005). Intracellular *Staphylococcus aureus* and antibiotic resistance: Implications for treatment of Staphylococcal Osteomyelitis. *Journal of Orthopaedic Research*, pp. 87-93.

Ferreira, C.; Pereira, A.M.; Melo, L.F. and Simões, M. (2010). Advances in industrial biofilm control with micro-nanotechnology. *In: Méndez-Vilas, A. Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*. Formatex Research Center, pp. 845-854.

Fux, C.A.; Costerton, J.W.; Stewart, P.S. and Stoodley, P. (2005). Survival Strategies of infectious biofilms. *TRENDS in Microbiology*, 13(1).

Fux, C.A.; Stoodley, P.; Hall-Stoodley, L. and Costerton, J.W. (2003). Bacterial biofilms: a diagnostic and therapeutic challenge. *Expert Reviews of Anti-Infective Therapy*, 1(4) pp.667-683.

Gera, C. and Srivastava, S. (2006). Quorum-sensing: The phenomenon of microbial communication. *Current Science*, 90(5), pp. 666-677.

Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W. and Stoodley, P. (2004). Bacterial Biofilms: From the Natural Environment to Infectious Diseases. *Microbiology*, 2, pp. 95-108.

Hall-Stoodley, L. and Stoodley, P. (2009). Evolving concepts in biofilme infections. *Cellular Microbiology*, 11(7), pp. 1034-1043.

Holmberg, A.; Lood, R.; Mörgelin, M.; Söderquist, B.; Holst, E.; Collin, M.; Christensson, B.; Rasmussen, M. (2009). Biofilm formation by *Propionibacterium acnes* is a characteristic of invasive isolates, *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 15, pp.787-795.

Khosravi, A.D.; Ahmadi, F.; Sadmanzadeh, S.; Dashtbozorg, A. And Abasi Montazeri, E. (2009). Study of Bacteria Isolated from orthopedic Implant Infections and their Antimicrobial Susceptibility Pattern, *Research Journal of Microbiology*, 4(4), pp. 158-163.

Kokare, C.R.; Chakraborty, S.; Khopade, A.N. and Mahadik, K.R. (2009). Biofilm: Importance and Applications, *Indian Journal of Biotechnology*, 8, pp.159-168.

Kumar, A. and Prasad, R. (2006). Biofilms. *JK Science*, 8(1), pp. 14-17.

Lima, A.L.; Pécora, J.R.; Albuquerque, R.M.; Pereira de Paula, A.; Oliveira D'Elia, C.; Godoy dos Santos, A.L. and Croci, A.T. (2004). Infecção pós-artroplastia total do joelho – Considerações e protocolo de tratamento, *Ata Ortopédica Brasileira*, 12(4), pp.236-241.

Nishimura, S.; Tsurumoto, T.; Yonekura, A.; Adachi, K. and Shindo, H. (2006). Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms isolated from infected total hip arthroplasty cases. *Journal of Orthopaedic Science*, 11, pp.46-50.

- O’Gara, J.P. and Humphreys, H. (2001). *Staphylococcus epidermidis* biofilms: importance and implications, *Journal of Medical Microbiology*, 50, pp. 582-587.
- Pasternak, J. (2009). Biofilmes: um inimigo invisível. [Em linha]. Disponível em <[http://www.sbcc.com.br/revistas\\_pdfs/ed%2039/39-Biofilmes.pdf](http://www.sbcc.com.br/revistas_pdfs/ed%2039/39-Biofilmes.pdf)> [Consultado em 11/10/2011].
- Prakash, B., Veeregowda, B.M. and Krishnappa, G. (2003). Biofilms: A survival strategy of bacteria. *Current Science*, 85(9), pp.1299-1306.
- Romaní, A.M.; Fund, K.; Artigas, J.; Schwartz, T.; Sabater, S. and Obst, U. (2008). Relevance of Polymeric Matrix Enzymes During Biofilm Formation. *Microbial Ecology*, 56, pp. 427-436.
- Rumjanek, N.G., Fonseca, M.C.C. and Xavier, G.R. (2004). Quorum Sensing em Sistemas Agrícolas. *Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento*, (33), pp.35-50.
- Sadovskaya, I.; Chaignon, P.; Kogan, G.; Chokr, A.; Vinogradov, E. and Jabbouri, S. (2006). Carbohydrate-containing components of biofilms produced in vitro by some staphylococcal strains related to orthopaedic prosthesis infections. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 47, pp.75-82.
- Salles, M.J.C. (2008). Tratamento das Infecções Associadas a Próteses Articulares Ortopédicas. *Prática Hospitalar*, (58), pp.12-15.
- Simões, M.; Cleto, S.; Pereira, M.O. and Vieira, M.J. (2007). Influence of biofilm composition on the resistance to detachment. *Water Science and Technology*, 55(8-9), pp. 473-480.
- Simões, M., Simões, L.C. and Vieira, M.J. (2010). A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT - Food Science and Technology*, 43, pp. 573-583.
- Sousa, C.; Henriques, M.; Azeredo, J.; Teixeira, P. and Oliveira, R. (2008). *Staphylococcus epidermidis* glucose uptake in biofilm versus planktonic cells. *World Journal of Microbiology Biotechnology*, 24, pp.423-426.
- Stewart, P.S., Costerton, J.W. (2001). Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *The Lancet*, 358, pp.135-138.
- Stoodley, P.; Boyle, J.D.; Dodds, I. and Lappin-Scott, H.M. (1997). Consensus Model of Biofilm Structure. “*Biofilms: Community Interactions and Control*” 3<sup>rd</sup> meeting of the Biofilme Club.
- Stoodley, P.; Sauer, K.; Davies, D.G. and Costerton, J.W. (2002). Biofilms as Complex Differentiated Communities. *Annual Review of Microbiology*, 56, pp. 187-209.

Stoodley, P.; Wilson, S.; Hall.Stoodley, L.; Boyle, J.D., Lappin-Scott, H.M. and Costerton, J.W. (2001). Growth and Detachment of Cell Clusters from Mature Mixed-Species Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(12), pp. 5608-5613.

Taylor, E. N.; Webster, T. J. (2009). The use of supermagnetic nanoparticles for prosthetic biofilm prevention, *International Journal of Nanomedicine*, 4, pp.145-152.

Trampuz, A. and Zimmerli, W. (2005). Prosthetic Joint infections: update in diagnosis and treatment. *Swiss Medical Weekly*, 135, pp. 243-251.

Widmer, A.F. (2001). New Developments in Diagnosis and Treatment of Infection in Orthopaedic Implants, *Clinical Infectious Diseases*, 33(2), pp. 94-106.