

Ana Carolina Lopes Caetano

Biofilmes e Antimicrobianos

Faculdade Ciências da Saúde

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2018

Ana Carolina Lopes Caetano

Biofilmes e Antimicrobianos

Faculdade Ciências da Saúde

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2018

Ana Carolina Lopes Caetano

Biofilmes e Antimicrobianos

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

Resumo

A formação de biofilmes é atualmente reconhecido como um dos fatores mais relevantes nas infecções crônicas. Estes são comunidades bacterianas agregadas, envolvidas numa matriz polimérica extracelular, com capacidades de adesão a superfícies bióticas e abióticas. A formação de um biofilme ocorre geralmente em várias etapas consecutivas.

As características importantes das infecções crônicas baseadas em biofilmes são a extrema resistência e tolerância aos antibióticos e a muitos outros agentes antimicrobianos convencionais bem como a capacidade extrema para evitar as defesas do hospedeiro. Deste modo, é urgente as pesquisas e os avanços da ciência bem como da tecnologia nesta área com o intuito de adquirir métodos mais rápidos para o diagnóstico dos biofilmes e consequente eficácia na terapêutica.

O tratamento de infecções por biofilmes é atualmente um desafio difícil e complicado para microbiologistas, clínicos, médicos e enfermeiros. Deste modo, é relevante conceber um algoritmo de atuação para controlo dos biofilmes no sentido de auxiliar os profissionais de saúde, e que permita também otimizar a identificação de biofilmes e terapêutica dos mesmos na prática clínica.

Como se explica a existência de biofilmes? Qual a necessidade de distinguir o paradigma plantónico do paradigma sésil? O paradigma sésil deverá ter mais relevância na clínica? Como combater este grave problema de saúde pública?

Palavras-chave: “Biofilmes”, “Resistência aos Antimicrobianos”, “Microorganismos”, “Antibiofilme”, “Diagnóstico do biofilme”, “Tratamento dos biofilmes”.

Abstract

Nowadays the formation of biofilms is recognized as one of the most relevant factors in chronic infections. Biofilms are aggregated bacterial communities, envolved in a polymeric extracellular matrix, with capability to adhere to abiotic and biotic surfaces. The formation of a biofilm, generally occurs in various sequential steps.

The important characteristics of chronic infections based in biofilms are the extreme resistance and tolerance to antibiotics and many other conventional antimicrobial agents, as well as the extreme capability to evade the host's immune system.

In this manner, the researchs and scientific advancements as well as technological improvements are urgent, in order to acquiry faster methods for biofilm diagnosis and treatment efficacy.

Currently, the treatment of biofilm infections is difficult and complicated for microbiologists, doctors, practitioners and nurses. Therefore, it's relevant to conceive an algorithm for biofilm control, to auxiliare health care assistants, and to also permit biofilm identification and treatment in clinical practice.

How do we explain biofilm existence? What's the necessity to differentiatite the sessile and platonc paradigms? Is the sessile paradigm more relevant clinically? How to overcome this serious public health problem?

Keywords: Biofilm, Antimicrobial Resistance, Microorganisms, Antibiofilm, Biofilm Diagnosis, Biofilm Treatment.

Dedicatória

Decidi há muito tempo não caminhar à sombra de alguém. Se eu fracassar ou obtiver sucesso, terei vivido acreditando em mim.

(Whitney Houston)

Agradecimentos

Um agradecimento especial ao Professor, Doutor António Pedro Fonseca, pela confiança, apoio, disponibilidade, pelos ensinamentos constantes e pela motivação ao longo da realização da dissertação, tornando todos os problemas em soluções e mostrando que, com esforço, tudo se torna alcançável;

À Mafalda Abrantes e ao Pedro Santos pela amizade, a força e o apoio que me deram nos momentos mais complicados;

À Cláudia Costa, Gisela Pinto por terem estado sempre presentes em todos os momentos ao longo destes cinco anos, dando o seu apoio e partilhando alegrias e tristezas, tornando tudo mais fácil;

A todos os meus colegas e amigos, especialmente à Beatriz, Carolina, Inês e Sara pela preocupação, pela alegria e por saber que posso sempre contar com elas;

À minha cunhada Sara Campos pelo amor e amizade, pelo incentivo, dedicação e alegria contagiante, ajudando-me sempre a ultrapassar os obstáculos;

Aos meus pais, avós e em especial aos irmãos Mafalda, Miguel e Sofia, pelo apoio incansável, por me incentivarem a querer sempre mais, por acreditarem em mim, por toda a paciência e pelo amor incondicional.

A todos, o meu eterno Obrigada!

Índice Geral

| | |
|--|-----------|
| I. Introdução | 1 |
| II. Desenvolvimento | 4 |
| 1. Biofilmes | 4 |
| i. Definição, estrutura e formação de biofilmes | 4 |
| 2. Espécies microbianas relevantes para a formação de biofilmes e o aparecimento de doenças | 11 |
| i. Biofilmes e infecções associadas a superfícies bióticas | 11 |
| ii. Biofilmes e infecções associadas a superfícies abióticas | 12 |
| 3. Diagnóstico de infecções associadas a biofilmes | 16 |
| i. Métodos de detecção | 17 |
| ii. Limitações dos métodos de detecção e perspectivas futuras..... | 26 |
| 4. Estratégias usadas no tratamento e prevenção de biofilmes | 27 |
| i. Inibição da formação de biofilmes..... | 27 |
| ii. Mecanismos de resistência e tolerância dos biofilmes aos antimicrobianos | 32 |
| iii. Erradicação dos biofilmes..... | 35 |
| iv. Tratamento e gestão das infecções mediadas por biofilmes | 36 |

| | |
|---|-----------|
| v. Proposta de algoritmo para a detecção e tratamento de biofilmes..... | 42 |
| III. Conclusão e Perspetivas Futuras | 43 |
| IV. Referências Bibliográficas..... | 45 |

Índice de Tabelas

| | |
|--|----|
| Tabela 1: Diferenças entre as bactérias no estado plântónico e os biofilmes | 5 |
| Tabela 2: Microrganismos responsáveis pela formação de biofilmes envolvidos em infeções humanas presentes em superfícies bióticas | 11 |
| Tabela 3: Microrganismos responsáveis pela formação de biofilmes envolvidos em infeções humanas presentes em superfícies abióticas | 13 |
| Tabela 4: Características gerais que apontam para a presença de um biofilme | 16 |
| Tabela 5: Amostras biológicas a serem recolhidas para posterior análise laboratorial | 18 |
| Tabela 6: Técnicas de diagnóstico para identificar existência de processos infecciosos | 20 |

Índice de Figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1: Fluxograma de diversidade de espécies microbianas que constituem os biofilmes | 4 |
| Figura 2: Principais parâmetros que influenciam a estrutura do biofilme e que tornam cada um deles único | 7 |
| Figura 3: Propriedades dos biofilmes e que influenciam a sua formação | 8 |
| Figura 4: Proposta de algoritmo para a detecção e tratamento de biofilmes | 42 |

Lista de Abreviaturas

AMPs: Péptidos antimicrobianos

CLSM: Microscopia de varrimento laser

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

EPS: Substância polimérica extracelular

ESI-MS: Espectroscopia de Massa com Ionização por Electrospray

FC: Fibrose Cística

FISH: Hibridização fluorescente in situ

MALDI-TOF: Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz

MBEC: Concentração Mínima de Erradicação do Biofilme

MIC: Concentração Mínima Inibitória

PCR: *Polimerase chain reaction*

PHMB: Polihexametileno biguanida ou polihexanida

QS: Quorum sensing

SEM: Microscopia eletrónica de varrimento

TZP: Piperacilina/Tazobactama

I. Introdução

Nas últimas décadas, microbiologistas e especialistas em doenças infecciosas constataram uma mudança radical na forma como se encaram as infeções. Causadoras de milhões de mortes até meio do século XX, doenças infecciosas como o tétano, difteria, cólera, caracterizadas por terem uma evolução aguda e serem tratáveis com antibióticos, progressivamente deram lugar a infeções de carácter crónico, as quais frequentemente alternam com fases aguda de exacerbação, refratárias a antibioterapia, e com mecanismos patogénicos pouco estabelecidos. Apesar de não estar ainda totalmente esclarecido, pensa-se que as infeções com evolução aguda envolvem células microbianas independentes, ou seja, no estado plantónico. Por outro lado, estudos *in vitro* e *in vivo* providenciam que muitos tipos de infeções crónicas são sustentadas por agregados microbianos sésseis conhecidos como biofilmes (Batoni *et al.*, 2015).

Os biofilmes são comunidades polimicrobianas, ou seja, comunidades estruturadas de células bacterianas envolvidas numa matriz polimérica extracelular em constante mudança, com capacidade de adesão a superfícies abióticas e bióticas, causando infeção permanente. Destacam-se como exemplos de superfícies abióticas os cateteres utilizados em tratamentos médicos ou mesmo os biomateriais, e de superfícies bióticas o epitélio pulmonar no caso da Fibrose Cística (FC) (Fricks-Lima *et al.*, 2011).

Durante anos a microbiologia tradicional caracterizou como plantónicas as células encontradas em suspensão. Depois destas células serem avaliadas, isoladas e identificadas descobriu-se que algumas das bactérias plantónicas estudadas têm a capacidade de aderir a várias superfícies formando biofilmes e encontrando-se assim no estado sésil (Santos *et al.*, 2013).

Embora os clínicos destaquem os meios de cultura e provas com microrganismos para auxiliar no diagnóstico de infeções agudas e selecionar as terapêuticas com antimicrobianos mais apropriadas, este fenótipo não é representativo da forma em que se encontram a maioria das espécies microbianas (Høiby *et al.*, 2015).

Estima-se que 99.9% de todos os microrganismos conhecidos aderem preferencialmente a superfícies e comunidades sésseis, pois estas oferecem uma fonte de nutrientes abundante, proteção e segurança importante (Cowan, 2011; Cooper *et al.*, 2014).

Assim, a compreensão da natureza das espécies microbianas poderá ajudar os profissionais de saúde na prevenção e tratamento das infecções associadas a biofilmes bem como a novas doenças no futuro. Dado que as estratégias de diagnóstico e de terapia ainda representam um desafio para este grupo de profissionais, nos últimos anos tem-se presenciado um aumento significativo da investigação científica na área dos biofilmes, cujo conhecimento produzido é fundamental na tomada de decisão clínica (Pedro *et al.*, 2012).

Atualmente é necessário realizar um “update” do paradigma comum contaminação-infeção, ou seja, é necessário deixar de se associar o organismo à doença que este provoca. Desta forma, no caso de infecções por biofilmes propõe-se haver uma rutura dos Postulados de *Koch* no que diz respeito à colheita, transporte, processamento laboratorial e por fim diagnóstico e terapêutica, de modo a permitir uma melhor abordagem destes casos.

Assim é importante que os profissionais de saúde tenham um conhecimento profundo tanto da etiologia, desenvolvimento e progressão dos biofilmes, assim como dos métodos de diagnóstico, de modo a adaptar a melhor terapia. Com o desenvolvimento deste tema, podemos ainda concluir que, para além das técnicas de diagnóstico e terapêutica, os profissionais de saúde deveriam debruçar-se também na prevenção da formação de biofilmes.

Objetivos

Esta dissertação, intitulada “Biofilmes e antimicrobianos”, tem como objetivo apresentar conceitos sobre os biofilmes, diferenciar o paradigma plantónico do paradigma sésil e a adesão a superfícies bióticas e abióticas e, por fim, compreender as interações existentes na trilogia hospedeiro, microrganismo e antimicrobianos.

Para além disso, pretende-se conceber um algoritmo de atuação para controlo dos biofilmes no sentido de auxiliar os profissionais de saúde, e que permita também otimizar a identificação de biofilmes e terapêutica dos mesmos na prática clínica.

Metodologia

A revisão bibliográfica consistiu na pesquisa de artigos científicos publicados nos últimos anos, uma vez que é um tema recente. Efetuou-se uma pesquisa intensiva nos diversos motores de busca como *PubMed*; *SciELO*; *B-On*; *Science Direct*, tendo-se também recorrido ao repositório da Universidade Fernando Pessoa.

Nesta revisão, incluíram-se artigos que faziam referência a métodos de diagnósticos de biofilmes e técnicas de identificação do mesmo, bem como artigos relacionados com a terapêutica de biofilmes.

A pesquisa eletrónica realizou-se empregando as palavras-chaves com ou sem combinações entre si: “Biofilm”, “Antimicrobial resistance”, “Microorganisms”, “Antibiofilm”, “Biofilm diagnostic”, “Biofilm treatment”.

II. Desenvolvimento

1. Biofilmes

i. Definição, estrutura e formação de biofilmes

A diversidade metabólica e a capacidade de adaptação ao stress ambiental são características fundamentais dos microrganismos (Trentin *et al.*, 2013).

Assim, atualmente o crescimento bacteriano é caracterizado por dois tipos de fenótipos como células individuais, no estado plantónico, e no estado sésil em comunidades estruturadas como organismos pseudomulticelulares ou biofilmes presente em grande parte nos ecossistemas naturais e patogénicos (Fonseca, 2011; Trentin *et al.*, 2013).

Os microrganismos representam 10% da constituição do biofilme, que possuem uma enorme diversidade de espécies microbianas como fungos, protozoários e vírus bem como agregados de múltiplas espécies bacterianas. (Menoita *et al.*, 2012).

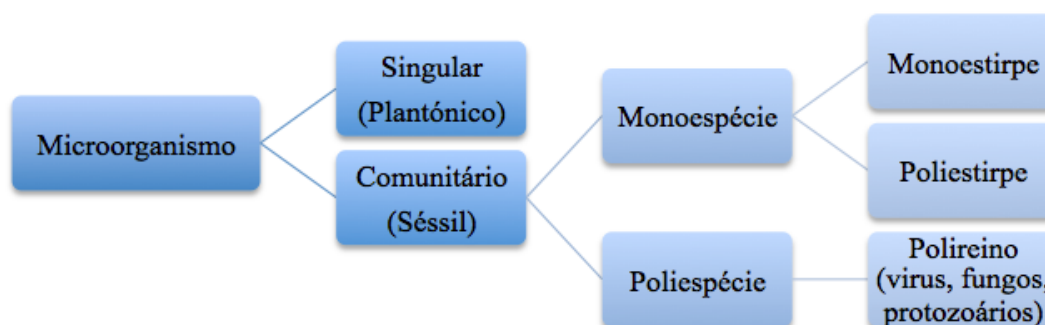


Figura 1: Fluxograma de diversidade de espécies microbianas que constituem os biofilmes (adaptado de Ganesh *et al.*, 2014).

A maior investigação sobre a patogénese microbiana foi-se centrando ao longo dos anos nas infeções agudas associadas a células no estado plantónico que permitem a rápida

proliferação e propagação dos microrganismos para outros locais. Assim, segundo os postulados de *Koch* cada tipo de microrganismo infeccioso provoca uma doença específica (Jerez, 2015; Percival *et al.*, 2010).

No entanto estas doenças têm sido complementadas com uma nova categoria de infeções crónicas causadas por bactérias que crescem em agregados microbianos conhecidos como biofilmes. Deste modo esta recente categoria de infeções crónicas desvaloriza os Postulados de *Koch* (Jerez, 2015).

Tabela 1: Diferenças entre as bactérias no estado plantónico e os biofilmes (adaptado de Behlau *et al.*, 2008).

| | Bactérias Plantónicas | Bactérias no Biofilme |
|---------------------------------|--|---|
| Células | Suspensas e isoladas. Fisiologicamente ativas e são suscetíveis a antibióticos | Agregados de células e múltiplas células numa interface. 10 a 1000 vezes mais resistentes a antimicrobianos |
| Matriz | Ligeiramente capsular | EPS envolvem a matriz |
| Sinalização intracelular | Não é essencial para a divisão celular | Fundamental para o crescimento e formação organizada |
| Resposta imune | Reconhecimento de células individuais pelo hospedeiro | Resposta inatingível do hospedeiro pois as células estão envolvidas numa matriz e são resistentes aos agentes antimicrobianos. Pseudofagocitose – A fagocitose é impossível dado ao comportamento coletivo das bactérias. |

A agregação inicial das bactérias é provavelmente um mecanismo padrão através do qual elas interagem umas com as outras. A formação adicional do biofilme progride pela adaptação das bactérias às condições nutricionais e ambientais disponíveis (Bjarnsholt, 2013).

Os biofilmes são entidades dinâmicas que se desenvolvem de acordo com um processo bem definido que envolve três estágios: adesão, maturação e dispersão. Todas as etapas envolvem processos complexos, nomeadamente físicos, químicos e biológicos que governam a adesão bacteriana, a formação de biofilmes e a coesão persistente (Lazar, 2011).

A adesão bacteriana seja a uma superfície biótica ou abiótica é um processo complexo. Assim, a adesão pode ser reversível pois os microrganismos regressam à forma plântica ou irreversível onde se começa o desenvolvimento do biofilme. Para esta etapa inicial é necessária a presença e funcionalidade de várias adesinas, tais como flagelos e fimbrias IV de células hospedeiras que são importantes na mobilidade *swimming* e *twitching*, respetivamente (Fonseca, 2011).

A atração inicial das bactérias à superfície ocorre através do movimento browniano (deslocamento aleatório das bactérias num meio) ou de modo dirigido através de quimiotaxia e motilidade (flagelos e pili). Inicialmente os microrganismos na forma plântica condicionados por interações físico-químicas não específicas fixam-se a uma superfície. Estas interações podem ser electrostáticas, hidrofóbicas, forças de Van der Waals, ligações por hidrogénio, ácido-base e adesinas. Contudo, nesta fase a adesão ainda é reversível (Batoni *et al.*, 2015; Pedro *et al.*, 2012; Trentin *et al.*, 2013).

Após a adesão reversível, os microrganismos fracamente ligados multiplicam-se, diferenciam a sua expressão genética e aderem firmemente à superfície através de interações moleculares mais específicas entre estruturas bacterianas (pili, fimbrias IV) e moléculas do hospedeiro que funcionam como recetores. Deste modo a adesão torna-se irreversível.

A adesão bacteriana é a correlação multifacetada de três componentes a bactéria, a superfície (biótica e biótica) e o microambiente em que os microrganismos se encontram (Fonseca, 2006; Trentin *et al.*, 2013).

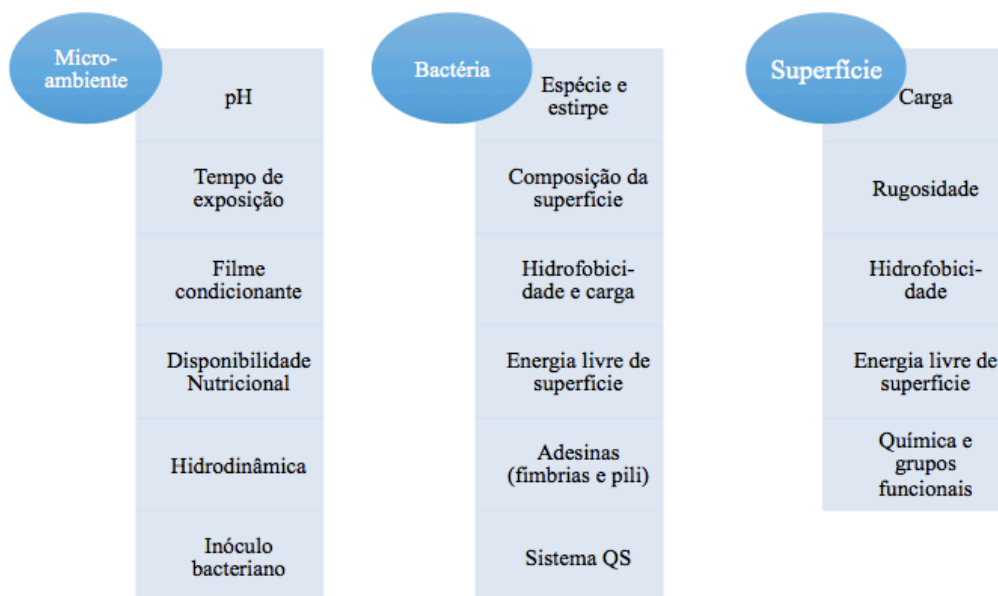


Figura 2: Principais parâmetros que influenciam a estrutura do biofilme e que tornam cada um deles único (adaptado de Flemming *et al.*, 2016; Trentin *et al.*, 2013).

As características que tornam o biofilme uma estrutura clinicamente relevante, incluem as distintas propriedades físico-químicas, arquitetura e capacidade de comunicação intercelular e regeneração celular ativa (Fonseca, 2007; Pinto *et al.*, 2018).

Com o início da maturação celular, as células começam a dividir-se e a formar pequenos agregados celulares e caracterizados pela ocorrência do *Quorum Sensing* (QS) (Fonseca, 2011). QS é um mecanismo de comunicação entre bactérias, através da produção e difusão de pequenas moléculas químicas ou sinalizadoras. QS permite a coordenação do comportamento bacteriano em relação ao meio ambiente, regulando a expressão de genes especializados, em resposta à densidade populacional (Lazar, 2011; Pinto *et al.*, 2018).

De modo geral, os biofilmes estão envolvidos por uma matriz de substância polimérica extracelular (EPS) autoproduzida. Os EPS contribuem para a arquitetura do biofilme proporcionando um ambiente hidratado que favorece a adesão. Os componentes dos EPS são os polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos e em menor quantidade lípidos, fosfolípidos e outros polímeros que não se distribuem homogeneamente (Behau *et al.*, 2008; Simões *et al.*, 2010).

A matriz tem um papel central no mecanismo de resistência dos biofilmes aos antibióticos tendo como principal objetivo manter as associações microbianas e proteger contra fagócitos e antibióticos. Porém sabe-se muito pouco sobre a matriz dos biofilmes, não existindo perfis bioquímicos completos porque as diferentes bactérias parecem produzir diferentes componentes da matriz (Batoni *et al.*, 2015; Bjarnsholt, 2013).

Por último a fase de dispersão envolve a disseminação das células (individuais ou em grupos) a partir de um biofilme ou substrato para o ambiente circundante e constitui um fator importante na disseminação de uma infecção (Stoodley *et al.*, 2001; Pedro *et al.*, 2012).

A dispersão do biofilme pode ocorrer por dois processos, como a erosão e a descamação. A erosão indica o desprendimento contínuo de uma única célula ou de pequenas porções do biofilme e pode ser afetada pela espessura do biofilme, tensão de corte, fluido e velocidade do fluido (Kumar *et al.*, 2006) e a descamação é caracterizada pela perda rápida e maciça do biofilme (Stoodley *et al.*, 2001; Pedro *et al.*, 2012).

Os microrganismos podem atuar de forma sinérgica no biofilme devido à sua capacidade de comunicarem uns com os outros assegurando a sobrevivência coletiva e individual. Isto leva a que algumas espécies prosperem juntas e formem comunidades polimicrobianas que têm maior virulência e patogenicidade (Trentin *et al.*, 2013).

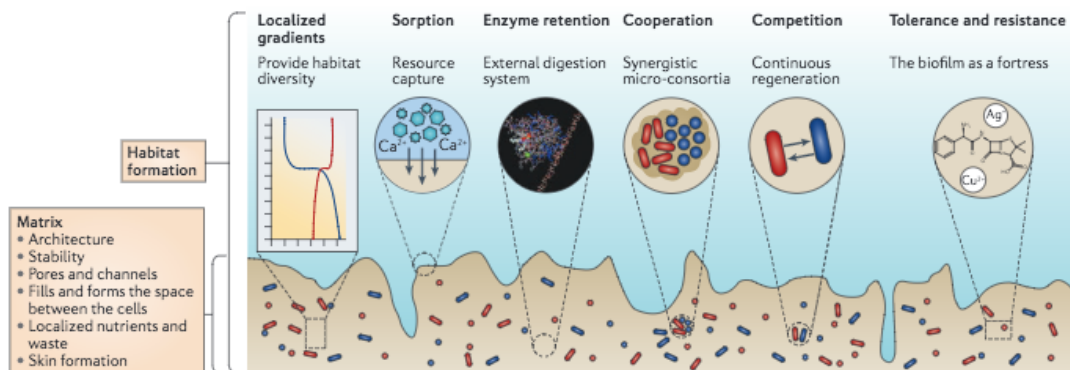


Figura 3: Propriedades dos biofilmes e que influenciam a sua formação (Flemming *et al.*, 2016).

A heterogeneidade é outra característica dos biofilmes. Os EPS levam ao estabelecimento de gradientes estáveis que proporcionam diferentes habitats localizados em pequena escala. Em um biofilme aeróbico copiotrófico, consoante a quantidade de oxigénio observamos os organismos estratificados sendo que nas camadas profundas encontram-se os que sobrevivem sem oxigénio porque o consumo de oxigénio por organismos aeróbios nas camadas superficiais do biofilme é mais rápido do que a taxa de difusão (Behlau *et al.*, 2008).

Da mesma forma, em biofilmes oligotróficos aeróbios, o consumo de nutrientes por organismos nas camadas superiores resulta na inanição de organismos nas camadas inferiores, o que pode levar à adoção de estados de crescimento lento, como os encontrados em células latentes ou mesmo na morte celular (Flemming *et al.*, 2016).

A troca de nutrientes e metabolitos é facilitada por canais de água que fornecem meios efetivos 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).

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).

A riqueza de alimentos no biofilme é incomparável com as células que se encontram ao seu redor uma vez que a concentração de nutrientes é proporcional ao número de células bacterianas associadas. Além disso mesmo quantidades baixas de nutrientes proporcionam o crescimento do biofilme, uma vez que a matriz do biofilme se encontra carregada negativamente e atrai nutrientes, principalmente catiões, para a superfície do biofilme (Prakash *et al.*, 2003).

Uma propriedade emergente dos biofilmes é a capacidade de sobreviver à exposição de compostos antimicrobianos, incluindo desinfetantes, metais tóxicos e antibióticos que podem atuar por vários mecanismos (Behlau *et al.*, 2008).

A tolerância, que é um fenótipo não hereditário, pode surgir quando os EPS da matriz enfraquecem a atividade de antimicrobianos por inibição da reação de difusão que diminui a concentração de antimicrobianos para concentrações sub-letais podendo levar à sobrevivência das células expostas e ao desenvolvimento de resistência antimicrobiana ou como consequência dos estados de crescimento lento que são adotados por muitas células de biofilme que permite a tolerância de fármacos antimicrobianos que visam processos metabólicos que ocorrem durante o crescimento. A resistência aos antimicrobianos também pode aumentar nos biofilmes como resultado da disseminação de genes de resistência entre células por transferência de genes horizontais que é facilitado pela proximidade de células do biofilme entre si (Flemming *et al.*, 2016; Omar *et al.*, 2017).

O estudo sistemático do desenvolvimento de doenças humanas com origem em biofilmes é apesar de tudo muito recente. Apenas nas últimas décadas se iniciou o estudo dos mecanismos moleculares responsáveis pela regulação da comunicação e adesão celular entre bactérias, o papel da matriz exopolisacarídica na gênese e manutenção dos biofilmes e a influência do microambiente iônico e nutricional na formação e dissolução dos biofilmes (Pratt *et al.*, 1999). Será assim necessário aguardar para que metodologias de prevenção e controle mais eficazes surjam e sejam adaptadas à rotina clínica.

Na obstante das diferentes etiologias, as infecções por biofilmes apresentam características muito particulares e comuns (Marcia *et al.*, 2014). Estas são:

- ✓ Desenvolvimento preferencial do biofilme em superfícies abióticas (superfícies inertes e instrumentos médicos) ou tecidos mortos;
- ✓ Taxa de crescimento lenta;
- ✓ Produção e libertação de antigénios e formação específica de complexos imunes que conduzem à lesão de tecidos adjacentes;
- ✓ Agravamento da condição infecciosa em indivíduos imunocomprometidos;
- ✓ Elevada resistência a antibióticos, sendo necessário recorrer a métodos mecânicos para remoção do biofilme;

- ✓ Separação e migração de células bacterianas do biofilme, originam novas infeções agudas noutra local.

2. Espécies microbianas relevantes para a formação de biofilmes e o aparecimento de doenças

i. Biofilmes e infeções associadas a superfícies bióticas

Nos últimos anos certificou-se que os biofilmes microbianos tem um papel preponderante na patogénese de infeções crónicas.

Segundo *National Institutes of Health*, dados de 2002 apontam que cerca de 80% de todas as infeções médicas a nível mundial estão associadas a biofilmes (Trentin *et al.*, 2013). São exemplo dessas infeções a conjuntivite, a dermatite, a endocardite, as feridas crónicas, a FC, as infeções do trato urinário, a osteomielite, a otite média persistente, a periodontite, a prostatite, a vaginite, a sinusite crónica (Henriques *et al.*, 2013; Trentin *et al.*, 2013).

Os biofilmes que se formam em superfícies bióticas normalmente adquirem uma estrutura mais complexa em comparação com os que desenvolvem numa superfície abiótica. Isto deve-se à ação de fibronectina, fibrinogénio, elastina e colagénio do hospedeiro que em conjunto com os EPS participam na formação do biofilme (Campoccia *et al.*, 2006).

Os doentes imunocomprometidos apresentam um défice em combater organismos patogénicos invasores sendo assim a formação do biofilme e posterior desenvolvimento de uma infeção um processo relevante nestes doentes (Donlan *et al.*, 2002).

Tabela 2: Microrganismos responsáveis pela formação de biofilmes envolvidos em infeções humanas presentes em superfícies bióticas (adaptado de Trentin *et al.*, 2013).

| Infeção ou doença | Microrganismo responsável |
|------------------------------|---|
| Cáries dentárias | <i>Streptococcus mutans</i> |
| Esófago | <i>Candida</i> spp. |
| FC | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ; <i>Burkholderia cepacia</i> |
| Infeções musculoesqueléticas | <i>Staphylococcus</i> spp. |
| Infeções do trato biliar | <i>Escherichia coli</i> |
| Melioidose | <i>Burkholderia pseudomallei</i> |
| Osteomielite | <i>Staphylococcus aureus</i> |
| Otite média | <i>Staphylococcus aureus</i> |
| Periodontite | <i>Porphyromonas gingivalis</i> ; <i>Prevotella intermedia</i> ; <i>Fusobacterium nucleatum</i> |
| Prostatite | <i>Escherichia coli</i> ; <i>Chlamydia trachomatis</i> ; <i>Mycoplasma</i> |
| Trato respiratório | <i>Streptococcus pneumoniae</i> ; bacilos Gram-negativos |
| Vagina | <i>Candida</i> spp. |

ii. Biofilmes e infeções associadas a superfícies abióticas

Os biofilmes foram observados pela primeira vez nos anos 80, através de microscopia eletrónica que revelou a presença de bactérias depositadas na superfície de um dispositivo médico. Assim apareceram as primeiras infeções clínicas associadas a biofilmes. São exemplos dessas os cateteres venosos, arteriais e urinários, dispositivos intrauterinos, implantes ortopédicos e da mama, lentes de contato, *pacemakers* e próteses (Hall-Stoodley *et al.*, 2012).

Devido ao aumento da esperança média de vida da população existe uma crescente necessidade de utilização de implantes biomédicos para substituir e/ou para reparar tecidos de funções biológicas (Behlau *et al.*, 2008; Trentin *et al.*, 2013). Todos os implantes médicos estão suscetíveis ao risco de colonização microbiana e infeção devido ao défice

imunológico que se manifesta no local da interface implante-hospedeiro (Trentin *et al.*, 2013).

Tabela 3: Microrganismos responsáveis pela formação de biofilmes envolvidos em infecções humanas presentes em superfícies abióticas (adaptado de Davey *et al.*, 2000; Pinto, 2016).

| Tipos de implante | Microrganismo responsável | Doença associada/ Consequências |
|--|--|--|
| Cateteres venosos | <i>Staphylococcus</i> coagulase negativos (SCoN); <i>Staphylococcus aureus</i> ; <i>Enterococcus faecalis</i> ; <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ; <i>Klebsiella pneumoniae</i> ; <i>Candida</i> spp. | |
| Cateteres urinários | <i>Escherichia coli</i> ; <i>Proteus mirabilis</i> ; SCoN; <i>Enterococcus faecalis</i> ; <i>Candida</i> spp. | Bacteriúria |
| Cateter intravascular | <i>Staphylococcus epidermidis</i> ; <i>Staphylococcus aureus</i> | Septicemia e endocardite |
| Coração artificial | <i>Staphylococcus epidermidis</i> ; <i>Staphylococcus aureus</i> ; <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Septicemia, falha do dispositivo |
| Dispositivos intrauterinos | <i>Staphylococcus epidermidis</i> ; <i>Enterococcus</i> spp.; <i>Streptococcus</i> b-hemolítico; Lactobacilos | Bacteriúria |
| Enxertos vasculares | SCoN; <i>Staphylococcus aureus</i> ; <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e outros Gram negativos | |
| Lentes de contacto | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e cocos Gram positivos | Queratite |
| Cateteres de diálise peritoneal | <i>Staphylococcus aureus</i> ; <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ; <i>Candida</i> spp.; outros Gram | Peritonite |

| | | |
|------------------------------------|--|----------------------------------|
| | negativos | |
| Prótese de válvula cardíaca | <i>Staphylococcus epidermidis</i> ; <i>Streptococcus viridans</i> ; <i>Staphylococcus aureus</i> ; <i>Streptococcus</i> spp.; <i>Enterococcus</i> spp.; <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ; <i>Candida</i> spp.; <i>Aspergillus</i> spp. | Endocardite |
| Proteses ortópédicas | <i>Staphylococcus epidermidis</i> ; <i>Staphylococcus aureus</i> ; | Septicémia, falha do dispositivo |
| Prótese das cordas vocais | <i>Staphylococcus</i> spp.; <i>Streptococcus</i> spp. | Falha da prótese |
| Tubos endotraqueais | Gram negativos entéricos; <i>Staphylococcus</i> spp.; <i>Streptococcus</i> spp.; <i>Enterococcus</i> spp. | Pneumonia |

Os organismos presentes em dispositivos médicos que formam biofilmes podem ter origem na pele de doentes 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 doente (Donlan, 2001).

Relativamente ao *Staphylococcus aureus* é o principal causador de infeções associadas a implantes biomédicos com crescente importância na medicina moderna (Trentin *et al.*, 2013). É considerada uma bactéria de alta virulência relacionada com a maioria das infeções sendo a produção de exotoxinas o principal fator de virulência. É uma bactéria com rápido desenvolvimento e que apresenta várias resistências aos antibióticos tendo assim a capacidade de a partir de uma infeção aguda evoluir para uma infeção crónica e persistente (Magalhães, 2011).

A *Pseudomonas aeruginosa* é um tipo de microrganismo formador de biofilme, capaz de causar infeções crónicas progressivas em doentes com FC. É um patogénico oportunista que, tal como outras bactérias Gram negativas, tem um sistema regulador que controla a

expressão de múltiplos genes, QS, muitos deles associados à formação de biofilmes e produção de fatores de virulência (Fonseca, 2006; Fonseca, 2007; Hall-Stoodley *et al.*, 2009).

A introdução de dispositivos implantáveis tem-se tornado indispensável em quase todas as áreas da medicina, particularmente nas unidades de cuidados intensivos uma vez que uma grande percentagem das infecções hospitalares, cerca de 60%, está relacionada com a formação de biofilmes nestes dispositivos. Estes permitem salvar vidas e aumentar a qualidade de vida de muitos doentes (Behlau *et al.*, 2008).

3. Diagnóstico de infecções associadas a biofilmes

As infecções associadas a biofilmes apresentam vários desafios à prática clínica de rotina, muito devido à dificuldade de determinar se a infecção é devida à presença do biofilme ou se é devida à presença de microrganismos plantônicos. Apesar da sua importância no diagnóstico, e tendo sido formulados ainda no início século XIX, os postulados de *Koch* foram desenvolvidos para determinar as consequências clínicas de uma infecção derivada de um agente patogénico em concreto, que deveria ser posteriormente isolado em cultura. No caso dos biofilmes, os postulados de *Koch* não se aplicam dado que o conceito de etiologia mono-microbiana face aos recentes estudos efetuados não se concretizam, e a persistência destes métodos de diagnóstico extremamente limitantes origina uma elevada percentagem de falsos negativos quanto à presença de biofilmes (Høiby *et al.*, 2015).

É assim pertinente fazer um diagnóstico correto e atempado pois, por exemplo, prevê-se que entre os mais de 60 000 doentes com Fibrose Cística (FC) em países ocidentais desenvolvidos, cerca de 80% irão desenvolver uma infecção crónica pulmonar associada a biofilmes, bem como infecção dos seios perinasais. Em doentes com infecções crónicas associadas a feridas, os quais representam cerca de 1-2% da população ocidental, mais de 60% dessas infecções estão associadas a biofilmes. Relativamente aos doentes com dispositivos ortopédicos, prevê-se que 0,5-2% irão desenvolver uma nos dois primeiros anos de período pós-operatório (Hall-Stoodley *et al.*, 2012; Høiby *et al.*, 2015; Trentin *et al.*, 2013).

Atualmente, existe um conjunto de características gerais que apontam para a presença de um biofilme, tornando assim possível a sua correta deteção. Estas encontram-se enumeradas na tabela 4.

Tabela 4: Características gerais que apontam para a presença de um biofilme (adaptado de Høiby *et al.*, 2015).

Características
Gerais

Sinais clínicos de infecção (baixo grau de reações inflamatórias, como edema, rubor, dor, perda de função e, por vezes, febre baixa).

Antecedentes médicos de condição predisponente de biofilmes (dispositivos médicos implantados, fibrose cística)

Infeção persistente conduração superior a 7 dias (não é específico pois a resistência aos antibióticos provoca o mesmo)

Falha no tratamento antibiótico e recorrência de infecção (principalmente se se tratar do mesmo microorganismo)

Evidência documentada/antecedentes de falha de antibioterapia

Evidência de sinais sistémicos ou sintomas de infecção que resolvem com antibioterapia, reaparecendo após cessação da terapêutica

i. Métodos de deteção

A identificação da presença de um biofilme pelas técnicas abaixo descritas é da maior importância para determinar qual a estratégia de tratamento a ser adotada, uma vez que a eficácia desta está dependente da deteção ou não do biofilme (Høiby *et al.*, 2015).

A existência de critérios gerais para efetuar um diagnóstico diferencial para infeções associadas a biofilmes deverá ajudar a melhor identificar e a distinguir este tipo de infeções de infeções plânticas agudas e assim obter amostras clínicas apropriadas e fornecer as informações necessárias para melhorar a rotina da clínica laboratorial (Hall-Stoodley *et al.*, 2012).

As estratégias de diagnóstico, e posterior tratamento, são assim definidas tendo por base inicial o tipo de biofilme presente. Podem assim dividir-se os biofilmes em dois tipos distintos (Hall-Stoodley *et al.*, 2012; Høiby *et al.*, 2015; Trentin *et al.*, 2013):

- Presentes no muco/tecido e não associados à presença de corpos estranhos;
- Aderidos a um corpo estranho.

De um modo geral, os biofilmes presentes no muco incluem doentes com FC e infeções respiratórias crónicas, e doentes com infeções crónicas devido á presença de feridas, enquanto que os biofilmes aderidos a um corpo estranho incluem infeções derivadas da adesão do biofilme a dispositivos médicos introduzidos no organismo, ou seja, infeções associadas com próteses, tubos endotraqueais, cateteres intravenosos e urinários, implantes mamários (Trentin *et al.*, 2013).

Apesar de se fazer esta divisão geral é importante saber que muitas outras infeções associadas a biofilmes estão retratadas em *guidelines*, como por exemplo, nas de endocardite, otite média, sinusite crónica, stents biliares, shunts, lentes de contactos, cateteres de diálise, dentárias, dispositivos intrauterinos, corações artificiais, válvulas prostéticas (Hall-Stoodley *et al.*, 2012; Høiby *et al.*, 2015).

Uma vez conhecido o tipo de biofilme, é importante identificar o tipo de amostra biológica a ser recolhida para posterior análise laboratorial. Abaixo esquematizadas, encontram-se as várias amostras biológicas que poderão ser recolhidas para posterior análise nos casos da FC, feridas crónicas e dispositivos ortopédicos (Høiby *et al.*, 2015).

Tabela 5: Amostras biológicas a serem recolhidas para posterior análise laboratorial (Høiby *et al.*, 2015).

| | |
|---|---|
| FC com infeção pulmonar crónica | <ul style="list-style-type: none"> • Escarros ou expectoração induzida • Lavados bronco-alveolar • Sucção endolaringea (crianças pequenas) |
| Ferida crónica | <ul style="list-style-type: none"> • Tecidos de biópsias |
| Infeções associadas a um dispositivo aloplástico ortopédico | <ul style="list-style-type: none"> • Líquido sinovial • Biopsia de tecidos periimplante • Remoção do dispositivo, prótese ou peça |

No caso da FC, o risco de contaminação das amostras com secreções da flora normal da orofaringe é elevado uma vez que os membros da flora (*Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Moraxella catarrhalis*) são agentes patogênicos pulmonares comuns em casos de FC (Bjarnsholt *et al.*, 2009).

Nas feridas crônicas a amostra mais viável são os tecidos de biópsia pois um dos maiores problemas é a recolha das amostras da superfície. O uso de zaragoas é um método impróprio devido à contaminação a partir da flora da pele, a forte aderência do biofilme ao epitélio hospedeiro e do crescimento de microrganismos anaeróbios nos tecidos profundos (Pinto *et al.*, 2018).

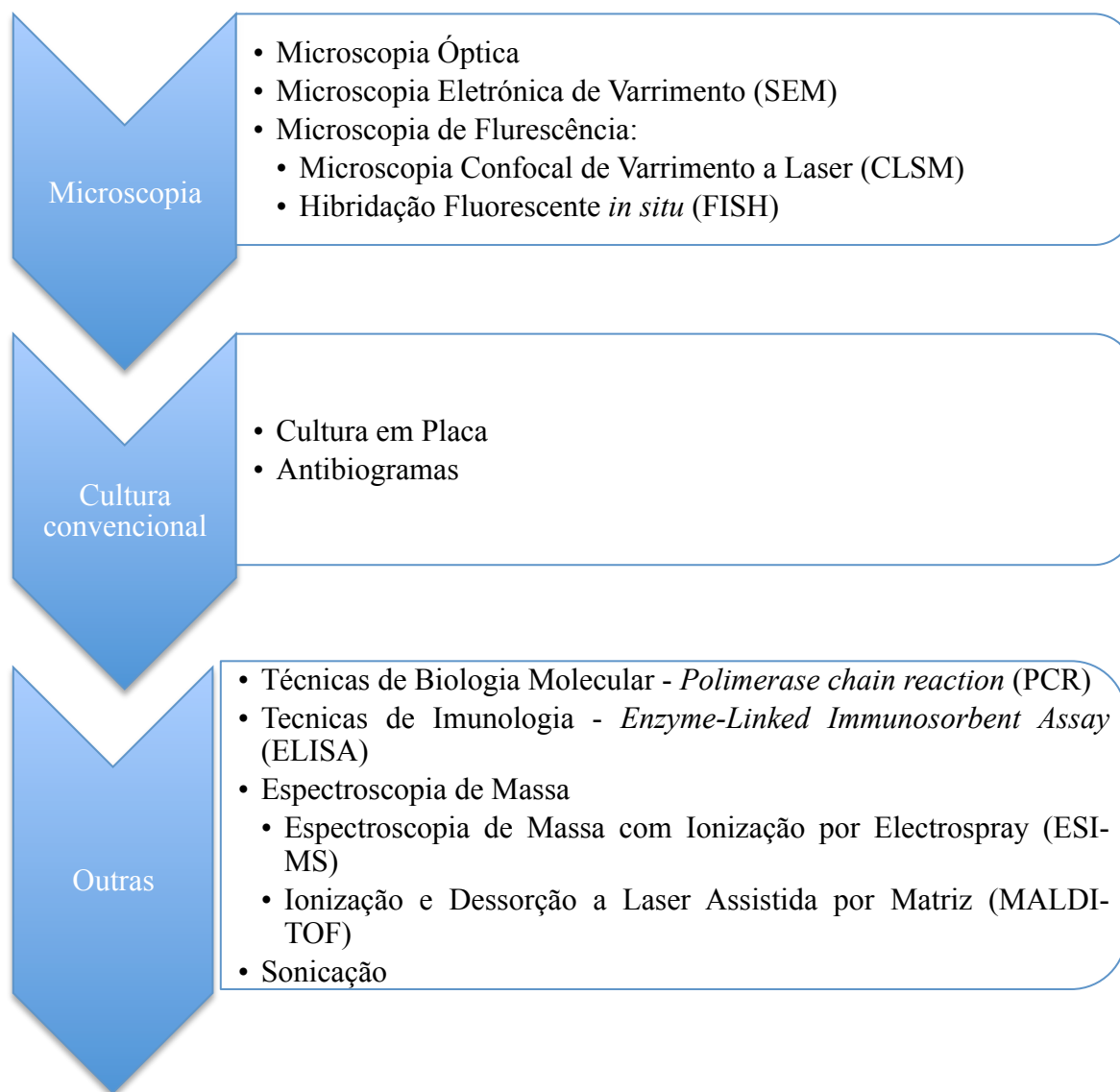
Nas infecções associadas a um dispositivo ortopédico, deve-se recolher uma amostra de líquido sinovial para contagem de células e análise microbiológica. Caso o resultado seja positivo, é indicado fazer um desbridamento, retirando-se amostras para realização de biópsia tecidual correspondente ao tecido com peri-implantite e remoção do dispositivo ou partes do mesmo, apresentadas na tabela 4 (Høiby *et al.*, 2015).

A remoção do dispositivo, prótese ou peça deve ser submetido a sonicação, processo este que consiste em energia aplicada diretamente na superfície dos implantes para romper o biofilme aderente e liberar as bactérias viáveis. As bactérias libertadas são posteriormente cultivadas num laboratório de microbiologia clínica (Bjarnsholt *et al.*, 2009).

A amostragem é muito importante não sendo conclusivo o resultado de apenas uma. Embora não esteja definido a 100% quantas amostragens e durante quanto tempo deverão ser feitas sabe-se que é necessário fazer no mínimo entre três a seis biopsias para se distinguir uma infecção de uma contaminação.

As técnicas de diagnóstico são várias e deverão demonstrar claramente a existência de processos infecciosos. Destacam-se assim as técnicas de Microscopia, Cultura em placa, Biologia Molecular, Imunologia, Espectroscopia, entre outras.

Tabela 6: Técnicas de diagnóstico para identificar existência de processos infecciosos (Høiby *et al.*, 2015; Hall-Stoodley *et al.*, 2012).



No que diz respeito à realização de cultura em placa, esta técnica permite a identificação *in vitro*, a partir de uma biópsia, o tipo de bactéria, o seu grau de virulência e capacidade de multiplicação. A principal desvantagem desta técnica é que a contagem de unidades

formadores de colónias (UFCs) pode dar origem a falsos positivos (Hall-Stoodley *et al.*, 2012).

Antibiogramas a culturas de células plantónicas recolhidas da biópsia do biofilme e determinação da dose de inibição mínima. Assim é possível determinar a resistência do microrganismo ao antibiótico. Depois de se observar se é sensível é necessário perceber até que ponto é sensível. O resultado do antibiograma, teste de sensibilidade aos antibióticos, e determinação da suscetibilidade das bactérias plantónicas por intermédio da determinação da concentração mínima inibitória (MIC) poderá ser de extrema importância para a terapêutica a ser adotada (Hall-Stoodley *et al.*, 2012; Høiby *et al.*, 2015).

A análise microscópica pode ser efetuada por intermédio da microscopia ótica e métodos de coloração de rotina, tais como a coloração Gram que pode ser aplicada tanto em tecidos como em muco, células inflamatórias, bactérias e matriz do biofilme (Bjarnsholt *et al.*, 2009). Apesar das colorações Gram demonstrarem a presença de agregados, sem no entanto possibilitar a identificação da espécie de microrganismo em questão, é uma ferramenta útil para detetar muito rapidamente a presença de biofilmes. No entanto, técnicas como SEM ou CLSM são mais apropriadas para a confirmação da presença de biofilmes em biópsias (Hall-Stoodley *et al.*, 2012).

SEM é uma técnica invasiva, dispendiosa e demora para demonstração da capacidade de formação de biofilmes em tecidos afetados. Através de um microscópio eletrónico é possível produzir imagens de alta resolução que tem uma aparência tridimensional característica permitindo avaliar a estrutura superficial de uma dada amostra (Bose *et al.*, 2016).

As técnicas de microscopia a aplicar dependem do tamanho do biofilme. Com esta técnica podemos observar a presença de leucócitos indicativos da existência de um processo infeccioso, e microrganismos sob a forma de agregados organizados numa matriz autoproduzida e distinta dos tecidos e microambiente que a rodeiam (Høiby *et al.*, 2015).

As técnicas de microscopia são variadas dividindo-se assim em: microscopia ótica, SEM e microscopia de fluorescência, nas quais se incluem FISH e CLSM.

A técnica de FISH permite o estudo de amostras de tecidos complexos e avaliar a presença de agregados bacterianos realçando a organização espacial do biofilme. É uma técnica independente de culturas bacterianas para detetar a presença de agregados e ao mesmo tempo que permite a co-localização de outros tipos celulares. Esta técnica citogenética tem como fundamento determinar identidade e localização de sequências ácidos nucleicos (DNA ou RNA) específicas, por intermédio da ligação complementar de sondas comercialmente obtidas e com sequências nucleotídicas conhecidas *a priori*, e às quais se encontram acopladas fluorocromos. A complementaridade das sequências do DNA/RNA alvo com a sonda permite a identificação, enquanto a emissão de fluorescência no caso de ligação complementar bem sucedida permite a localização celular. Deste modo, efetua-se a identificação dos microrganismos pertencentes ao biofilme, e o seu local de posicionamento. (Fonseca, 2011; Høiby *et al.*, 2015; Bose *et al.*, 2016).

Uma vez que utilizando a técnica de FISH é possível também detetar e localizar alvos específicos de RNA, a deteção do RNA ribossomal poderá facilmente indicar a atividade metabólica bacteriana, através do estabelecimento de padrões de expressão génica temporal e espacial. A principal desvantagem deste método é que para a sua realização é necessário a fixação e a permeabilização da amostra. Para além disso é muito dispendiosa, está pouco disponível na rotina clínica e existem poucas sondas de fluorescência disponíveis para o diagnóstico de biofilmes (Høiby *et al.*, 2015; Hall-Stoodley *et al.*, 2012).

Para além da técnica de FISH, também com a técnica de CLSM se observa a amostra biológica a 3 dimensões permitindo ver a composição e a distribuição de células vivas no interior da estrutura do biofilme *in vivo* e em tempo real (Fonseca, 2011).

Relativamente às técnicas de biologia molecular, mais propriamente o PCR convencional e o PCR em tempo real são utilizados para identificação de marcadores moleculares, ou seja, genes que estejam diferencialmente expressos devido ao aparecimento de eventos

patológicos. Estes são marcadores qualitativos, cuja sua presença pode ou não indicar a presença de biofilme.

A detecção do gene ribossomal 16S que funciona como uma espécie de impressão digital bacteriana, a utilização de SDS-PAGE (eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes) e sequenciação filogenética, técnica esta que permite descobrir a espécie da bactéria através de uma correspondência entre a sequência de DNA obtida pelo processo de sequenciação e sequências depositadas numa base de dados nucleotídica, são outras abordagens existentes para a identificação do tipo de microrganismo que compõem um determinado biofilme. As principais desvantagens destas técnicas é que não permitem distinguir bactérias no estado plantônico de bactérias presentes num biofilme. Para além disso, a detecção de uma bactéria não indica necessariamente que ela contribui de modo ativo para a patogénese da infeção, pois esta pode estar presente apenas como um contaminante. Outra desvantagem destas técnicas prende-se como a amostragem. A necessidade de dissociação da amostra previne, no entanto a avaliação microscópica dos agregados microbianos, a sensibilidade de detecção poderá não ser transponível para a sensibilidade do diagnóstico, presença de inibidores da reação de PCR em amostras complexas e amplificação de DNA de microrganismos não viáveis, são problemáticas que tornam a interpretação dos resultados de PCR por vezes ambíguas quando fora do contexto do diagnóstico em questão e dos dados clínicos disponíveis. Todas estas são, no entanto, técnicas altamente específicas, pois permitem saber o tipo de bactéria, e também muito sensíveis possibilitando detetar microrganismos, mesmo quando presentes em número muito reduzido. Apesar de apresentarem enumeras desvantagens, não deixam de ser técnicas muito robustas e ferramentas importantes que devem ser tidas em conta no momento do diagnóstico (Hall-Stoodley *et al.*, 2012; Bose *et al.*, 2016).

A sequenciação filogenética através da pirosequenciação permite detetar múltiplas espécies em múltiplas amostras em simultâneo, tornando possível a caracterização da comunidade bacteriana presente no microambiente do biofilme (Hall-Stoodley *et al.*, 2012). A pirosequenciação é uma técnica altamente sensível que permite efetuar a sequenciação de moléculas de DNA. Ao contrário do método de Sanger, esta técnica baseia-se na detecção de

pirofosfato libertado durante a síntese de DNA, isto é, quando por ação da DNA polimerase é incorporado um novo nucleótido na cadeia de DNA, um grupo pirofosfato é libertado e convertido em ATP pela ATP sulfúrilase na presença de adenosina 5' fosfossulfato. As moléculas de ATP produzidas levam à conversão enzimática da luciferina em oxiluciferina, com consequente emissão de fotões que irão ser detetados. A quantidade de luz detetada é diretamente proporcional ao número de nucleótidos incorporados (Ronaghi, 2001; Dowd *et al.*, 2008). Deste modo, é facilmente obtida a informação do genoma microbiano que compõe o biofilme, e assim rapidamente identificar as espécies e estirpes bacterianas que dele fazem parte. Para além disso, a sensibilidade desta técnica faculta a informação sobre a existência de mutações genéticas que poderão de algum modo estar correlacionadas com a resistência a antibióticos, tão característica dos biofilmes (Cummings *et al.*, 2013).

Estas técnicas de biologia molecular podem ser complementadas com técnicas de microscopia (FISH, SEM) de modo a obter-se um resultado mais fidedigno uma vez que o PCR não fornece informação sobre a organização estrutural e distribuição espacial das bactérias no biofilme (Bjarnsholt, 2013).

A implementação de testes serológicos robustos e dirigidos para a deteção de antigénios específicos presentes em circulação é também uma ferramenta de enorme utilidade em casos de infeções derivadas de biofilmes (Hall-Stoodley *et al.*, 2012). A técnica de imunologia mais utilizada é ELISA que possibilita a quantificação de anticorpos IgG, IgM, IgA. Níveis elevados de anticorpos IgG contra antigénios de *Pseudomonas aeruginosa* em doentes com FC permite-nos diagnosticar o biofilme. Estes testes encontram-se validados e comercialmente disponíveis. Do mesmo modo, níveis elevados de anticorpos dirigidos a antigénios de outros tipos de bactérias que estão na origem de infeções por biofilmes em doentes com FC foram detetados, embora não hajam ainda testes comerciais disponíveis. Foi também reportada a presença de níveis elevados de IgM em resposta à presença do antigénio polisacarídico específico de biofilmes em infeções relacionadas com *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*. Por fim, níveis elevados de IgG e especialmente IgA em culturas aparentemente negativas, devem encorajar a procura de fócus ocultos, como por exemplo, os seios paranasais. A confirmação da presença de

microrganismos latentes ou não viáveis como resultado da aplicação terapêutica poderá ser efetuada por técnicas de PCR e biópsias mais invasivas. No entanto, não existem diretrizes gerais para a quantificação de anticorpos ou marcadores de inflamação específicos para infecções por biofilmes (Høiby *et al.*, 2011; Høiby *et al.*, 2015).

Também se pode fazer a quantificação de marcadores de inflamação tais como a proteína C reativa, taxa de sedimentação de Eritrócitos, leucócitos, estearase leucocitária e citocinas, no entanto, estes não são específicos pois não distinguem entre infecções causadas por bactérias no estado plântico e infecções por biofilme (Høiby *et al.*, 2015).

Outra técnica é a ESI-MS que utiliza uma abordagem para deteção de múltiplas sequências de DNA, ou seja, regiões conservadas como a do 16s ribossomal, genes de resistência a antibióticos e *housekeeping* genes específicos, de modo a identificar inequivocamente qual a espécie de bactéria, independentemente de qual ela seja. A ESI-MS leva a cabo a separação dos ampliações de DNA, medindo a sua massa de modo a obter informação suficiente para identificar qual a espécie do patogénico em questão, quer seja fungo ou bactéria. Mais ainda, esta técnica permite identificar microrganismos virais e protozoários, bem como fornecer informação sobre resistência microbiana e epidemiologia (Hall-Stodley *et al.*, 2012).

Para além da ESI-MS existe outra técnica de espectroscopia de massa é a MALDI-TOF que consiste num método no qual o material biológico é colocado numa placa que contém uma matriz polimérica que é posteriormente difundida com um laser que vaporiza a amostra ocorrendo ionização de várias moléculas que serão detetadas. O resultado observa-se num gráfico específico, pois para cada microrganismo existe um tempo de chegada diferente ao detetor. Esta técnica permite diagnósticos a espécies microbiológicas complexas. O uso destes estudos proteómicos permite um diagnóstico mais rápido que os métodos que utilizam ácidos nucleicos (Pasternak, 2012).

Sonicação (no caso de implantes/ próteses): seguida de cultura em placa, ajuda na determinação da existência de contaminações microbianas. Inclui Método de Brun-Buisson e Método de Maki (Høiby *et al.*, 2015).

Para alguns tipos de infecções, é necessário realizar em paralelo várias das técnicas acima descritas para um correto diagnóstico, pois só um ou dois parâmetros não são suficientes para determinar ou excluir qual o tipo, grau, estirpe, virulência entre outras características da infecção.

ii. Limitações dos métodos de detecção e perspectivas futuras

Em suma as técnicas de diagnóstico atuais apresentam várias limitações pois os métodos qualitativos apresentam pouca sensibilidade e especificidade e métodos para detecção *in vivo* de biofilmes em doentes são invasivos. Não estão definidos a 100% quantas amostragens e durante quanto tempo deverão ser feitas, uma vez que dependem do tipo de infecção, tipo de bactéria, origem e história clínica do doente. Para além disso, a determinação da etiologia bacteriana dependentes da recolha de células bacterianas presentes no biofilme. A recolha das células “certas” falha muito frequentemente, e a cultura em placas de agar refere-se a células no estado plantónico. Deste modo na maioria das vezes obtêm-se um diagnóstico errado com posterior falha no tratamento (Hall-Stoodley *et al.*, 2012).

Sendo cada vez mais atual a problemática dos biofilmes é necessário investigações urgentes para melhorar o diagnóstico destas infecções (Høiby *et al.*, 2015). Estas investigações deverão consistir:

- Caracterização exaustiva de antígenos específicos ao tipo de biofilme e detecção desses mesmos antígenos;
- Padronização dos testes para determinação da suscetibilidade e doses mínimas inibitórias eficazes de antibióticos;
- Determinar quais os modelos animais mais relevantes para o estudo de infecções crónicas;

- Algoritmos para diagnóstico de biofilmes para otimizar a identificação no laboratório de microbiologia clínica;
- Avaliar o impacto clínico de detecção do gene 16S rRNA em cateteres intravenosos;
- Investigar se probióticos e prebióticos reduzem a ocorrência de infecção por biofilme, podendo ser um método de prevenção.

4. Estratégias usadas no tratamento e prevenção de biofilmes

i. Inibição da formação de biofilmes

As estratégias de combate aos biofilmes podem ser divididas em dois segmentos, por um lado através da inibição da formação do biofilme e por outro lado a erradicação ou tratamento de biofilmes já formados (Trentin *et al.*, 2013).

A inibição da formação do biofilme relaciona-se com o bloqueio do crescimento bacteriano através do uso de compostos bactericidas e bacteriostáticos, e com a inibição da adesão bacteriana a uma superfície ou por meio de rompimento da comunicação celular, ou seja, após a etapa da adesão primária, a inibição da formação de biofilmes pode ser conseguida interferindo na sinalização intercelular bacteriana (Fonseca, 2007; Trentin *et al.*, 2013).

Na atualidade, existem substâncias com atividade bactericida, bacteriostática e antipatogénica que podem inibir o crescimento bacteriano (Fonseca, 2007).

O iodo é utilizado como antisséptico de largo espectro de atividade contra bactérias, fungos, protozoários e vírus. O iodo molecular tem o maior potencial microbiano, desnatura as proteínas, inativa as enzimas, os fosfolípidos estruturas da membrana que impedem as ligações de hidrogénio com os aminoácidos (Santos *et al.*, 2012a). Por apresentar baixa toxicidade não causa dano no hospedeiro a quando da supressão do biofilme (Pedro *et al.*, 2012).

O mel tem propriedades antimicrobianas e estimula a atividade anti-inflamatórias justificada pela capacidade de inativar o ferro livre que de outra forma catalisa a produção de radicais livres de oxigênio produzidos por peróxido de hidrogênio (Santos *et al.*, 2012a). Inibe a mitose celular, atuando em várias fases do desenvolvimento do biofilme em diferentes estirpes de bactérias e o risco de desenvolver resistências é reduzido, devido aos diversos mecanismos de ação que apresenta. Por ser higroscópico aumenta a osmolaridade e o teor elevado de glicose estimula a ação dos macrófagos e diminui o aporte de água às bactérias (desidrata-as) e o pH (Pedro *et al.*, 2012).

A prata é um agente antisséptico que exerce atividade antimicrobiana em diferentes partes da bactéria. Os diversos mecanismos de ação envolvem a ligação da prata à parede celular, com posterior destabilização da mesma, ocorrendo danificação das membranas intracelulares e nucleares, desnaturando as moléculas de DNA e RNA. Os íons de prata suprimem a infecção e toxinas bacterianas, e tem também capacidade para prevenir a formação de biofilmes. Apesar do espectro de ação largo, alguns investigadores referem que a prata pode ser tóxica para os queratinócitos e fibroblastos (Leaper *et al.*, 2015).

A polihexanida (PHMB) é um polímero sintético idêntico aos péptidos antibacterianos (AMPs). Danifica ou inativa o DNA bacteriano quando o PHMB, após penetração nas células alvo, se liga ao DNA e outros ácidos nucleicos. Reduz os biofilmes sem desenvolver resistência, sem riscos tóxicos e de reabsorção. Também é usado no rompimento das células alvo devido à fuga de íons de potássio e outros componentes citosólicos que causam morte da célula bacteriana. Dada a sua ampla ação antimicrobiana, anti-fúngica e anti-inflamatória, garante eficácia e segurança (Santos *et al.*, 2012a). Esta solução contém um surfactante, betaína que interfere na produção de homosserina lactona (fator de virulência) e no QS. É um surfactante alcaloide com alta solubilidade em água e induz um efeito de stress osmótico no fator de virulência produzido pelas *Pseudomonas aeruginosa*, que causa lise de macrófagos e leucócitos polimorfonucleares (Santos *et al.*, 2013).

Para além das substâncias existentes com atividade bactericida surgem novas abordagens

anti-biofilmes que podem ser usados em paralelo com os antimicrobianos clássicos. Este uso em simultâneo pode resultar num efeito sinérgico sobre o tratamento de infeções por biofilme (Fonseca, 2007).

Os bacteriófagos são vírus que infetam unicamente bactérias, são metabolicamente inertes e após infeção, reproduzem-se usando a bactéria hospedeira. Os bacteriófagos devido à sua replicação em células bacterianas hospedeiras e ao ciclo lítico são providos da capacidade de lisar a célula, e conseqüentemente eliminar a bactéria hospedeira. Este tipo de terapia é utilizada já há algumas décadas, e tem-se destacado devido ao desenvolvimento de mecanismos de resistência múltipla aos antibióticos por parte de determinadas espécies de bactérias. Dados experimentais e estudos clínicos reafirmam a potencialidade desta abordagem terapêutica ao evidenciarem que os bacteriófagos não só produzem efeitos positivos nos tecidos com infeção derivada da presença do biofilme, mas também em infeções conseqüentes da presença de dispositivos médicos. Em todas estas situações, os bacteriófagos são capazes de infetar e lisar tanto bactérias sensíveis como resistentes a antibióticos. Em conjunto com antimicrobianos verifica-se um efeito sinérgico, e as bactérias que são resistentes a um ainda podem ser mortas pelo segundo agente, pelo que é menos provável o aparecimento de resistência no uso de uma terapia combinada (Sun *et al.*, 2013).

A Lactoferrina (composto quelante de ferro) é uma proteína presente na maioria dos fluidos corporais que inibe a bactéria de aderir à superfície devido à sua capacidade de quelatar o ferro, diminuindo a disponibilidade deste e conseqüentemente evitar a adesão irreversível (Trentin *et al.*, 2013). Em concentrações sub-inibitórias a lactoferrina permite inibir a formação do biofilme de *Pseudomonas aeruginosa*, por estimular o movimento *twitching* da bactéria, sem inibir o crescimento bacteriano. Em concentrações mais elevadas também inibe o crescimento bacteriano, rompendo a membrana através da ligação aos lipopolissacarídeos. Apenas se os níveis de ferro forem aceitáveis, é que a *Pseudomonas aeruginosa* é capaz de se parar de mover e formar microcolónias com posterior formação de biofilme (Singh, 2002).

Ácido Etilenodiamino Tetra-acético (EDTA) é um composto orgânico que também diminui a disponibilidade do ferro, apresenta um efeito bactericida e impede a fixação das bactérias (Trentin *et al.*, 2013).

A desina sortase é uma enzima que se encontra em estudo para impedir a adesão bacteriana tanto a superfícies bióticas como a superfícies abióticas. É uma enzima de membrana com a função de catalisar reações de transpeptidação, ligando-se covalentemente às proteínas e ao peptidoglicano interferindo na montagem do pili poderão vir a ser um bom alvo para fármacos antiadesão, com amplas aplicações clínicas. As bactérias mutantes em sortase A (gene *strA*) apresentam uma deficiência de proteínas de superfície, no entanto, estudos concluíram que esta é menos virulenta que outras espécies. Para além disso, tanto o *S. mutans* como *S. epidermidis* secretam adesinas SpaP, o que leva a diminuição da adesão destas bactérias às superfícies da hidroxiapatita do esmalte dentário na presença de saliva. O metanotiosulfonato e, o ácido *p*-hidroxi-mercuribenzóico podem funcionar como inibidores da desina sortases de modo a bloquear a adesão das bactérias às superfícies revestidas com fibronectina (Chen *et al.*, 2011).

Os inibidores do *QS* são um método alternativo ao tratamento de infeções por biofilme em que ocorre inibição da produção de EPS devido à falta de ação do QS e consequentemente da impedem a adesão irreversível. A associação dos interferentes do sistema *QS* com antimicrobianos poderá aumentar a efetividade do controle de infeções bacterianas relacionadas com a formação de biofilmes (Lazar, 2011). As furanonas halogenadas e o peptídeo inibidor do RNA III (RIP) são exemplos destes inibidores (Trentin *et al.*, 2013). Os inibidores de sistemas de *QS* podem afetar a integridade do biofilme e desta forma tornar as bactérias mais suscetíveis à antibioterapia minimizando a possibilidade das bactérias se tornarem resistentes (Lazar, 2011).

Os AMPs ligam-se a moléculas carregadas negativamente na membrana do microorganismo, diminuindo a capacidade das bactérias desenvolverem resistência. Os AMPs podem ser otimizados através da modificação de sequências primárias de aminoácidos para aumentar a eficácia e estabilidade, criando bons modelos para o

desenvolvimento de novos agentes terapêuticos anti-infecciosos. Contudo, a sensibilidade dos AMPs às concentrações fisiológicas de sal, força iônica e pH em fluidos corporais desafia a aplicação clínica de AMPs. Um estudo recente revela os AMP especificamente direcionados (STAMPs) que exibem especificidade de morte contra uma ou duas espécies bacterianas. Estes são compostos por duas partes independentes unidas por uma sequência peptídica de fusão linear. Uma apresenta um domínio antimicrobiano otimizado que induz a morte e outra que apresenta um domínio de ligação específica de espécie em que um patogénico selecionado se liga e facilita a entrega direcionada do péptido antimicrobiano anexado. O péptido de fusão é relativamente estável e mantém a sua atividade antimicrobiana em fluidos corporais sob uma gama de condições fisiológicas. Esta terapia mostrou-se eficaz contra o patogénico *Streptococcus mutans* para o qual os STAMPs eliminam seletivamente *Streptococcus mutans* de um ambiente de espécies misturadas sem afetar estreptococos bucais não carcinogénicos estreitamente relacionados (Sun *et al.*, 2013).

O tratamento ultrassónico é descrito como a fragmentação física da barreira do biofilme causada por alta pressão e aumento de temperatura permite o aumento da permeabilidade da membrana e estimular o transporte e a absorção de antimicrobianos dentro do biofilme. Este recurso poderá melhorar significativamente os efeitos da vancomicina contra os biofilmes atingindo-se maior percentagens de células mortas (He *et al.*, 2011).

O xilitol ao comprometer o desenvolvimento da matriz e prejudica o espessamento da parede celular nas bactérias Gram positivas, intervém com a formação do biofilme.

O extrato de Giseng impede a formação de biofilmes da *Pseudomonas aeruginosa* ao potenciar os movimentos de *swimming* e *twitching* e diminuir o *swarming*. Também se conclui que o giseng permite dispersar biofilmes pré-formados de *Pseudomonas aeruginosa* (Wu *et al.*, 2011).

A serina protease é uma proteína secretada pelo *Staphylococcus epidermidis* capaz de inibir a formação e moderar a eliminação de biofilmes de *Staphylococcus aureus in vitro*, assim

como inibir a colonização nasal por *Staphylococcus aureus in vivo* evidenciando os potenciais efeitos das bactérias comensais (Iwase *et al.*, 2010).

Alguns produtos naturais, como os extratos aquosos da caatinga brasileira, o filtrado de bactérias da esponja marinha, o dipeptídeo cíclico do fungo associado à esponja marinha e o peptídeo esteroide da cera de ovos de carrapato bovino inibem a formação de biofilmes sem interferir no crescimento bacteriano. Também os taninos purificados de plantas medicinais, são considerados uma importante classe de compostos bioativos no bloqueio à formação de biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa* resultante da sua ação bacteriostática (Trentin *et al.*, 2013).

ii. Mecanismos de resistência e tolerância dos biofilmes aos antimicrobianos

Como já foi referido, as infecções causadas por biofilmes são especialmente difíceis de erradicar, tornando-se em infecções recorrentes. Atualmente é reconhecido o aumento da resistência aos antibióticos, no entanto, no caso dos biofilmes este problema torna-se ainda mais grave (Henriques *et al.*, 2013).

No estado plântico os principais mecanismos de resistência bacteriana ocorrem por alteração da permeabilidade, alteração do local de ação, bomba de efluxo e mecanismos enzimáticos.

A permeabilidade da membrana celular é essencial para que o antibiótico tenha o efeito desejado, quer seja bactericida quer bacteriostático. Nas bactérias Gram negativas, a membrana interna é constituída por fosfolípidos e a membrana externa por lípidos. A sua constituição confere uma lenta penetração do fármaco e a passagem pela membrana externa é realizada através das porinas, que formam canais hidrofílicos (Baptista, 2013; Pinto, 2016).

Neste tipo de resistência, a modificação da permeabilidade do antibiótico pode dever-se às alterações estruturais, do número, da seletividade ou do tamanho das porinas. Os antibióticos como os β -lactâmicos, fluoroquinolonas e tetraciclina penetram no interior da

célula através de porinas presentes na membrana externa. Qualquer diminuição na função ou quantidade de porinas levará à resistência da bactéria ao antibiótico, baixando o nível de antibiótico no interior da bactéria (Baptista, 2013).

No caso da alteração do local de ação é caracterizada pela diminuição ou mesmo ausência de afinidade do antibiótico ao local de ligação. Esta ocorre por alteração da estrutura do peptidoglicano, interferência na síntese de proteínas ou na síntese de ADN. Um exemplo são as proteínas no citoplasma que protegem o ribossoma de ser alvo das tetraciclinas. Estas atuam ligando-se ao ribossoma e alteram a sua conformação, protegendo o ribossoma da ação destes antibióticos (Baptista, 2013).

As bombas de efluxo são proteínas presentes nas membranas em que ocorre o transporte ativo dos antibióticos do meio intracelular para o meio extracelular. Os sistemas de efluxo podem contribuir para a resistência intrínseca e adquirida de Gram-negativos a antibióticos como cloranfenicol, quinolonas, tetraciclinas, pois estes inibem a biossíntese de proteínas e DNA (Saldanha, 2013).

Quando as células formam biofilmes, os genes destes mecanismos são regulados positivamente, havendo um aumento da expressão das bombas de efluxo (Pinto, 2016).

O mecanismo enzimático de resistência devido a inativação do fármaco resulta da produção, pela bactéria, de enzimas que degradam ou inativam o antibiótico. Existem três grandes estratégias, tais como, hidrólise, transferência de um grupo ou processo redox (Baptista, 2013).

Na hidrólise a estrutura dos antibióticos contém grupos ésteres e amidas, fazendo com que sejam suscetíveis às hidrolases. A quebra da ligação destes grupos é feita na presença destas enzimas, que podem ser excretadas pelas bactérias, atuando na inativação do antibiótico antes que este atinja o seu alvo (Pinto, 2016).

Na transferência de genes ocorre mecanismos de inativação por transferência de grupos, nos quais se realçam as enzimas transferases (Saldanha, 2013). No caso dos processos redox através de mecanismos enzimáticos, pode ocorrer a inativação em que ocorre oxidação ou redução induzida pela bactéria patogénica (Baptista, 2013).

Embora seja clara esta resistência ou tolerância, até à data pouco se sabe sobre os mecanismos de resistência dos biofilmes aos mesmo, contudo alguns autores propõem alguns:

- **A fraca penetração e difusão dos antimicrobianos**

Embora a matriz polisacarídica apresente uma arquitetura estável, os poros dentro desta são pequenos o suficiente para bloquear a passagem de certas moléculas, incluindo antibióticos (Saldanha, 2013).

- **Adsorção dos mesmos na matriz exopolimérica**

A adsorção destes medicamentos na própria matriz ocorre devido à sua natureza aniónica e hidrofílica. Assim, a concentração adequada do antimicrobiano não é atingida nos tecidos do hospedeiro nem no ambiente intracelular (Pinto, 2016).

- **Células persistentes (*persistor cells*)**

Estas resistem à morte quando expostas aos antimicrobianos mantendo-se num estado de dormência. Estas são capazes de sobreviver a elevadas concentrações de antimicrobianos por apresentarem variantes fenotípicas da população celular (Baptista, 2013).

- **A idade do biofilme**

É uma variável importante que pode influenciar a suscetibilidade dos microrganismos associados. Relataram que com o aumento da idade do biofilme, a matriz produzida

também aumenta verificando-se défices em gradientes de nutrientes e oxigênio que diminuem o metabolismo e as taxas de crescimento celular, provocando a redução da eficácia de vários agentes antimicrobianos, incluindo cefalotina, clindamicina, eritromicina e vancomicina (Saldanha, 2013).

- **Comunicação celular**

Esta comunicação pode ocorrer de duas maneiras. A primeira havendo trocas de material genético, uma vez que num biofilme as células estão mais próximas umas das outras. A segunda por ação do QS que permite as células funcionarem em associação havendo comunicação interbacteriana e intrabacteriana resultando na expressão de múltiplos genes que se tornam resistentes aos antimicrobianos (Lazar, 2011).

- iii. Erradicação dos biofilmes

A erradicação de biofilmes já formados ocorre através do uso de antimicrobianos e da substituição de dispositivos biomédicos (Trentin *et al.*, 2013).

Com o decorrer das investigações tem-se tentado encontrar antimicrobianos capazes de dissolver o biofilme através de enzimas e algumas outras moléculas capazes de desintegrar a matriz EPS que engloba as células bacterianas. Pretende-se que a enzima perfure a estrutura do biofilme e em associação com um agente antimicrobiano funcione como tratamento de infeções associadas a biofilmes (Trentin *et al.*, 2013).

Uma vez que a matriz do biofilme engloba material proteico, DNA extracelular e polissacarídeos torna o EPS suscetível à degradação por uma série de enzimas exogenamente adicionadas como a proteinase K, tripsina e DNaseI (Trentin *et al.*, 2013).

Como exemplo referem-se ao uso de enzimas como o alginato liase que se sabe que utilizando meios de cultura contendo alginato, as bactérias isoladas de biofilmes microbianos produzem uma classe de enzimas liases, que catalisam o rompimento de várias

ligações químicas, dentre elas a do alginato, sendo este um dos componentes da matriz do biofilme. Assim, o uso de enzimas do tipo alginato liase tem potencial de atacar a matriz dos biofilmes dificultando seu desenvolvimento e/ou destruindo as organizações já constituídas, degradando o polímero alginato e provocar erradicação de biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa* (Alkawash *et al.*, 2000).

Para além desta enzima também a adição de aniões polivalentes (poliaspartato) e/ou DNase, também ocasionaram erradicação de biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* (Mann *et al.*, 2009). As DNase I é capaz de digerir o DNA extracelular presente na estrutura do biofilme (Roy *et al.*, 2018).

A dispersina B, uma N-acetilglucosaminidase é um outro exemplo de enzima capaz de inibir a formação de biofilmes e de erradicar biofilmes de espécies de *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus aureus*, uma vez que uma hidrolase glicosídica, fragmenta polímeros N-acetilglicosamina (PNAG), uma substância polissacarídica extracelular que facilita a agregação de bactérias (Kaplan *et al.*, 2004; Roy *et al.*, 2018).

A concentração mínima de erradicação do biofilme (MBEC) mede a susceptibilidade do antibiótico específico para um biofilme. Estudos *in vitro* comparam os ensaios MIC e MBEC para avaliar as diferenças nos padrões de sensibilidade aos antibióticos de diferentes isolados de pacientes implantados com dispositivos médicos. Os resultados mostram que as bactérias em biofilmes são mais resistentes do que as comunidades plânticas. Deste modo é necessário uma maior quantidade de ciprofloxacina, cefoperazona/sulbactam e gentamicina para erradicar o biofilme *Klebsiella pneumoniae*, cefoperazona/sulbactam e gentamicina para erradicar o biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* (Mulla *et al.* 2016).

iv. Tratamento e gestão das infeções mediadas por biofilmes

Até à data, não existe nenhum estudo que identifique a eficácia de estratégias seletivas que visem a erradicação, tratamento e manutenção de infeções derivadas da presença de biofilmes. Muitas destas infeções são de difícil abordagem e frequentemente um tratamento

antibiótico exclusivo é ineficaz. Estudos *in vitro* demonstraram que biofilmes formados recentemente são passíveis de ser eliminados recorrendo apenas a tratamento com antibióticos, em comparação com biofilmes já bem desenvolvidos (Hengzhuang *et al.*, 2011). Assim sendo, um diagnóstico atempado terá um impacto muito positivo na eficácia do tratamento que o segue. Contudo, a facilidade diminuta de se efetuar um diagnóstico precoce da presença de uma infeção por biofilme leva a dificuldades acrescidas na escolha da terapêutica mais eficaz para erradicar a infeção/ biofilme (Wu *et al.*, 2014).

De um modo geral as diferentes estratégias terapêuticas podem ser sucintamente divididas em três categorias:

- **Infeções tecidulares:**

Desbridamento cirúrgico dos tecidos desvitalizados, seguida de irrigação continua e persistente e preferencialmente contendo um biocida e/ou antiséptico, e por último, aplicação de antibióticos parenterais com ação sistémica. Esta ação é um processo chave em feridas crónicas, pois ajuda a remover o tecido necrótico e conseqüentemente o biofilme. Poderá ser efetuada através de ultrassons, lavagem, agentes autolíticos, cirurgia e com aplicação de soluções de irrigação/lavagem (Percival *et al.*, 2015).

- **Infeções devidas à presença de um dispositivo médico:**

A remoção e/ou substituição do dispositivo adquire uma grande importância, e é um pré-requisito para a eliminação da infeção (Wu *et al.*, 2014).

Dos antimicrobianos sistémicos apenas 25-32% são eficazes contra biofilmes porque só suprimem as células que crescem rapidamente nos seus limites exteriores e não conseguem eliminar a causa da cronicidade devido aos mecanismos de sobrevivência dos biofilmes. Apenas as células plânticas são destruídas e as infeções continuam a propagar-se (infeções recorrentes e crónicas) após terminar a terapêutica com os antibióticos (Fonseca 2011).

- **Agentes antimicrobianos:**

A seleção de agentes terapêuticos requer antibióticos que consigam penetrar o biofilme garantindo uma eficaz concentração de antibiótico no local. De um modo geral, antibióticos como macrólidos, lincosamidas, tetraciclina, quinolonas, ácido fusídico, nitroimidazol, sulfamidas, oxazolidinonas, linezolida, daptomicina, rifampicina e possivelmente a ceftarolina penetram mais facilmente os tecidos e células do que os antibióticos beta-lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas e carbapenemos), glicopéptidos, polimixina ou aminoglicosídeos (Wu *et al.*, 2014).

A ação eficaz dos antibióticos está também condicionada à possível ocorrência de acidose no local da infecção, na medida em que baixos valores de pH diminuem os efeitos dos antibióticos. Isto deve-se ao processo inflamatório causado pelo biofilme com consequente aumento do metabolismo e consumo significativo de oxigênio que se não for suprimido induz a glicólise (Wu *et al.*, 2014). Deste modo, o tratamento antibiótico e correção dos distúrbios de pH deverão ser fatores a ter em conta para o tratamento de biofilmes. Mais ainda, está comprovado que a combinação de vários agentes antimicrobianos potencia as suas ações, sendo por isso não recomendada uma terapêutica monodirigida (Herrmann *et al.* 2010). Os parâmetros da farmacocinética e farmacodinâmica deverão também eles ser avaliados, de modo a que possa ser estabelecida uma concentração inibitória mínima e concentração de erradicação mínima e para minimizar o desenvolvimento de resistências antimicrobianas (Hengzhuang *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2014). As concentrações subinibitórias podem influenciar os parâmetros de virulência bacteriana pois promovem a perda de adesinas (afeta capacidade de adesão) e determinam a hidrofobicidade da superfície celular, assim como diminuem a formação do biofilme (Fonseca *et al.*, 2006).

Em cirurgias ortopédicas o aparecimento de infeções por biofilme é reduzido, caso sejam administrados antibióticos profiláticos (via oral e intravenosa) pré-cirurgia. Por outro lado, há evidências que em profilaxia o uso tópico de alguns antibióticos (gentamicina, vancomicina e tobramicina) impregnados nos materiais de implantes ortopédicos reduzem a curto prazo a incidência de infeção por biofilmes associados à prótese (Høiby *et al.*, 2015).

Relativamente às feridas, Aquacel Ag⁺ Extra (ConvaTec), é o primeiro penso desenho para gerir biofilmes, bem como, para promover a cicatrização dos pacientes debilitados com feridas recalcitrantes, e estudos demonstram a eficácia clínica do mesmo (Metcalf *et al*, 2016).

Este penso perturba a estrutura do biofilme devido ao efeito sinérgico que ocorre entre os componentes do mesmo. Apresenta duas camadas de carboximetilcelulose de sódio impregnadas com 1,2% de prata iónica (agente antimicrobiano) melhorada com EDTA (agente quelante) e cloreto de benzetónio (surfactante quaternário catiónico), a um pH de 5,5. O pH ácido é preferível porque as feridas são tipicamente alcalinas e as enzimas proteolíticas encontradas nas feridas tem pico de atividade a pH alcalino ou neutro, assim como aumenta a atividade da prata iónica e diminui a integridade do biofilme (Bowler, 2015; Bowler *et al.*, 2016).

Em pacientes com cateteres urinários ou stents uretrais a administração de antibióticos (via oral e intravenosa) pode adiar o aparecimento de infeção por biofilme, no entanto, não é aconselhada a administração profilática de antibióticos, uma vez que existem espécies multirresistentes que podem causar uma superinfeção. Todavia o revestimento dos cateteres com agentes antimicrobianos tópicos como o nitrofurazona pode adiar a curto prazo as infeções por biofilme mas não pode prevenir. Contudo, alguns estudos afirmam que adiar o efeito é o suficiente para prevenir infeções associadas a biofilmes em cateterismos (Høiby *et al.*, 2015).

No caso de infeções na corrente sanguínea relacionadas com cateter não são recomendados antibióticos (via oral e intravenosa) para profilaxia. Apesar disso, o uso de curativos impregnados com combinação de clorhexidina e sulfadiazina de prata faz reduzir a incidência de infeções na corrente sanguínea relacionadas com cateter considerando-se assim o seu uso rentável. Porém, após implementação de todas as medidas preventivas ainda seja elevado o risco de infeção deve-se revestir o cateter com associação de dois antimicrobianos (miniciclina/rifampicina) que são mais eficientes que os anteriormente referidos (Jamal *et al*, 2014).

Em doentes com FC as nano-partículas lipossômicas são cada vez mais uma das novas abordagens para combater os biofilmes. Estas apresentam atividade antimicrobiana intrínseca. Os lipossomas são vesículas fisiologicamente compatíveis que são compostas por uma ou mais bicamadas de fosfolípidos e representam uma das nano-partículas orgânicas mais amplamente desenvolvidas para a administração de drogas. Eles são capazes de penetrar bem no biofilme, são bio-compatíveis e evidenciam eficácia contra biofilmes de uma ampla gama de espécies bacterianas para um número diversificado de antibióticos (Koo *et al.*, 2017).

As nano-partículas lipossômicas podem proteger o agente antimicrobiano de interações prejudiciais com a matriz, inativação enzimática e degradação no local da infecção por outros componentes bacterianos e do hospedeiro. A estrutura lipídica também pode ser fundida com a membrana bacteriana externa, liberando o fármaco diretamente para a célula, maximizando assim os efeitos terapêuticos potencialmente enquanto reduz a citotoxicidade do hospedeiro (Ansari *et al.*, 2014).

Assim, várias formulações estão atualmente em estudos pré-clínicos e ensaios clínicos. Contudo algumas já se encontram comercialmente disponíveis como a ciprofloxacina-lipossomal e a amicacina que são promissoras em doentes com FC (Koo *et al.*, 2017).

Em doentes com FC, Piperacilina/Tazobactama (TZP) é uma combinação de antibióticos contendo uma penicilina de largo espectro e um inibidor de β -lactamase. É eficaz contra *Pseudomonas aeruginosa* e outras bactérias Gram-positivos e Gram-negativos. Esta combinação de antibióticos é comercializada sendo o nome comum dos medicamentos Tazocin e Zosyn.

No caso da *Pseudomonas aeruginosa* estudos relatam que o imipenem, a levofloxacina e a ceftazidina apresentam uma correlação positiva entre a resistência a estes antimicrobianos e a formação de biofilmes. Não se observou correlação com a tobramicina mas observou-se que o TZP não interfere com a formação de biofilmes. As concentrações sub-inibitórias de

TZP diminuem a aderência bacteriana e a formação de biofilmes (Fricks-Lima *et al*, 2011; Fonseca, 2004).

Para além disso também se concluiu que para prevenir Pneumonias Associadas a Ventiladores (VAP) deve haver uma descontaminação seletiva do tubo endotraqueal. Deste modo estes devem ser impregnados com antissépticos ou antimicrobianos como por exemplo a prata. Esta apresenta menor incidência de VAP e um atraso no início da mesma (Fricks-Lima *et al*, 2011).

Em suma, o efeito do tratamento pode ser monitorizado por sinais ou por sintomas clínicos bem como por testes clínicos através da deteção de microrganismos a partir de amostras obtidas a partir do foco de infeção do biofilme por meio de técnicas de cultura, microscopia ou através da observação de melhorias de parâmetros inflamatórios como o volume expiratório forçado (observado através da espirometria) no caso de doentes com FC.

Em caso de terapia bem sucedida, mesmo que se observe melhoria dos parâmetros inflamatórios ou diminuição/estabilização dos anticorpos é difícil saber se o biofilme foi eliminado pois o microrganismo pode sobreviver e dar origem a uma recaída após interrupção da terapêutica antimicrobiana.

Por fim, também é desconhecido quando a terapia supressiva de antibiótico deve ser interrompida ou se a doença subjacente ainda está presente. Apenas nos doentes com FC e infeção por biofilme é que se conhece que a terapia supressiva ou terapia de manutenção crónica é de longa duração.

v. Proposta de algoritmo para a deteção e tratamento de biofilmes

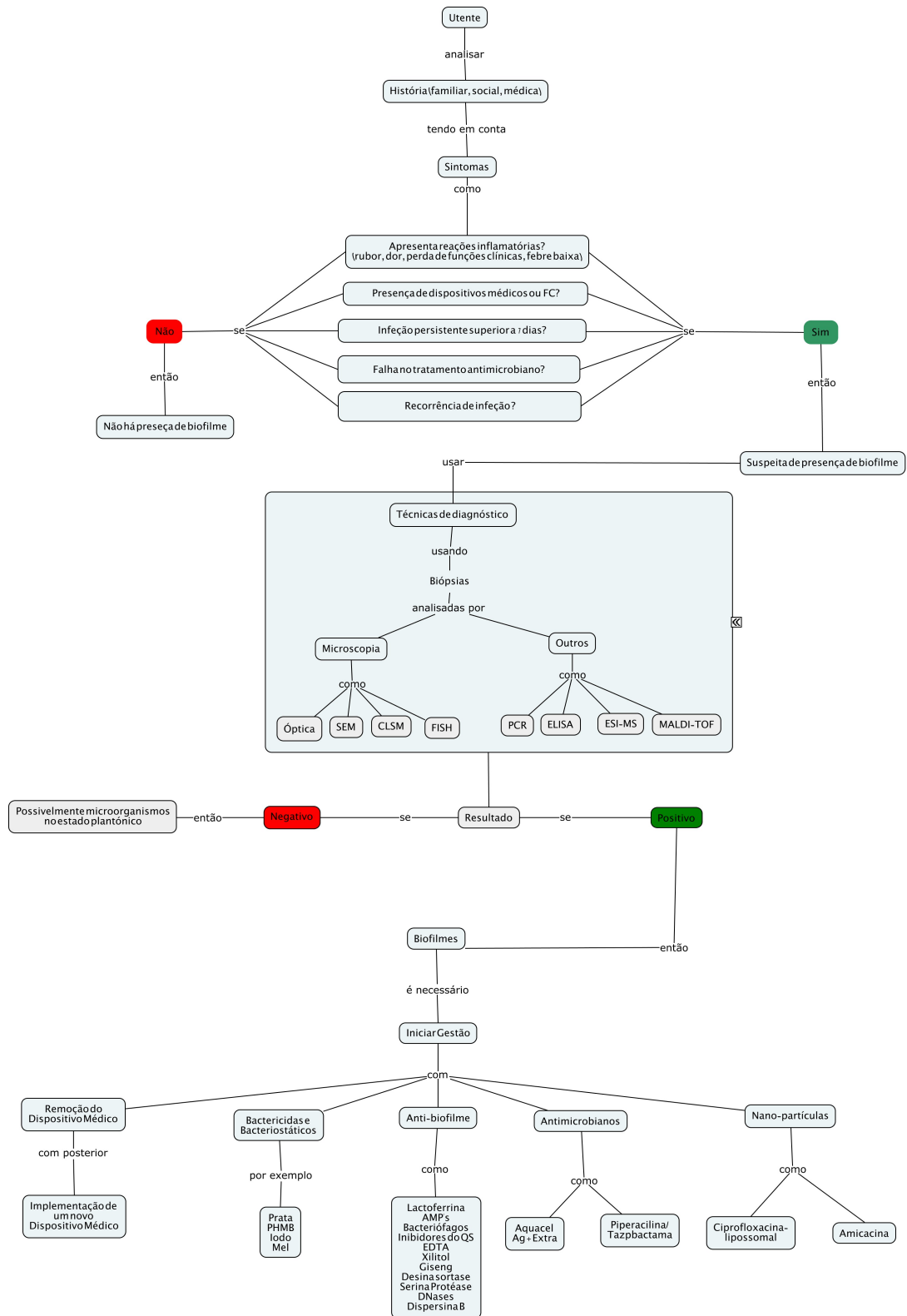


Figura 4: Proposta de algoritmo para a deteção e tratamento de biofilmes

III. Conclusão e Perspetivas Futuras

O tratamento de infeções por biofilmes é atualmente um desafio difícil e complicado para microbiologistas, clínicos, médicos e enfermeiros. Nos últimos anos, vários relatórios da comunidade científica alertaram para a necessidade acrescida de desenvolver medicamentos antibacterianos para a resolução de problemas associados à resistência aos antimicrobianos. Contudo, apesar de diversas pesquisas com o objetivo de descobrir novo fármacos antimicrobianos ou de novas modificações dos fármacos já existentes no mercado, não há garantias que as atuais pesquisas possam a longo prazo vencer o rápido desenvolvimento da resistência microbiana.

O diagnóstico e a terapêutica das infeções causadas por biofilmes é um processo complexo, sendo assim importante os clínicos estarem informados e consciencializados para o paradigma séssil começando assim a haver um novo olhar para o diagnóstico e reforçando a importância da prevenção no ato médico.

Atendendo à literatura é possível concluir que os antibióticos podem eliminar os sintomas de infeção provocadas pelos biofilmes mas não o próprio biofilme, levando ao aparecimento de infeções recorrentes.

O desafio é a necessidade de terapias combinadas em que por um lado se utilizam os antimicrobianos para eliminação dos microrganismos e por outro lado métodos que permitem a degradação simultânea da matriz de EPS, para que não haja recidivas. Deste modo, é urgente avanços rápidos em métodos de descoberta que devem acelerar a identificação de inibidores de EPS, indutores de dispersão de biofilmes e agentes que visam células latentes, bem como terapias que melhoram a resposta imune inata do hospedeiro (Koo *et al.*, 2017).

As pesquisas têm-se dividido em dois grupos: pesquisas científicas e pesquisas tecnológicas. Por um lado, as científicas procuram novos compostos, sejam eles sintéticos, vegetais ou animais. Por outro as tecnológicas procuram melhorias na farmacocinética do

fármaco (administração, absorção, tempo de semivida) e na farmacodinâmica (novos recetores menos suscetíveis a resistências), sendo este um dos principais desafios para a indústria farmacêutica.

Assim, a clínica depende da eficácia da tecnologia, mas também das agências reguladoras e da indústria para trazê-la para o mercado. Deste modo as diretrizes futuras devem se concentrar na obtenção de eficácia e especificidade máxima com toxicidade mínima e efeitos terapêuticos a longo prazo, juntamente com parcerias industriais para desenvolver formulações práticas e de baixo custo para uso clínico (Koo *et al.*, 2017).

Deste modo, o tratamento de infecções por biofilmes precisa de cooperação multidisciplinar entre clínicos e investigadores de forma a otimizar o trabalho em equipa e a partilha de recursos.

IV. Referências Bibliográficas

Alkawash, M.A., Soothill, J.S., Schil-Ler, N.L. (2006). Alginate lyase enhances antibiotic killing of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms. *Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica*, 114, pp. 131-138.

Ansari, M.A., Khan, H.M., Khan, A.A., *et al.* (2014). Gum arabic capped-silver nanoparticles inhibit biofilm formation by multi-drug resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Basic Microbiology*, 54, pp. 688-699.

Baptista, M. (2013). Mecanismos de Resistência aos Antibióticos. *Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia*.

Batoni, G., Maisetta, G., Esin, S. (2015). Antimicrobial peptides and their interaction with biofilms of medically relevant bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, *in press*.

Behlau, I., Gilmore, M. S. (2008). Microbial biofilms in ophthalmology and infectious disease. *Archives of Ophthalmology*, 126(11), pp. 1572-1581.

Bjarnsholt, T. (2013). The role of bacterial biofilms in chronic infections. *Blackwell*, 121 (136), pp. 1-51.

Bose, S., Ghosh, A. K., Deorukhkar, S. (2016). Fungal Biofilm and Medical Device Associated Infection: It's Formation, Diagnosis and Future Trends: A Review. *Annals of Pathology and Laboratory Medicine*, 3 (1).

Bowler, P. (2015). A real-life clinical evaluation of a next-generation antimicrobial dressing on acute and chronic wounds. *Wounds*, 5(6), pp. 9.

Bowler, P. G., Parsons, D. (2016). Combatting wound biofilm and recalcitrance with a novel anti-biofilm Hydrofiber® wound dressing. *Wound Medicine*, 14, pp. 6-11.

Campoccia, D., Montanaro, L., Arciola, C. R. (2006). The significance of infection related to orthopedic devices and issues of antibiotic resistance. *Biomaterials*, 27(11), pp. 2331-2339.

Chen, L., Wen, Y. M. (2011). The role of bacterial biofilm in persistent infections and control strategies. *International Journal of Oral Sciences*, 3, pp. 66-73.

Cooper, R.A., Bjarnsholt, T., Ahede, M. (2014). Biofilms in wounds: a review of present knowledge. *Journal of Wound Care*, 23(11), pp. 570-82.

Cowan, T. (2011). Biofilms and their management: from concept to clinical reality. *Journal of Wound Care*, 20(5), pp. 220-6.

Cummings, P. J., Ahmed, R., Durocher, J. A., *et al.* (2013). Pyrosequencing for microbial identification and characterization. *Journal of Visualized Experiments*, (78), pp. 50405-50405.

Davey, M.E., O'ttole, G.A. (2000). Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64 (4), pp. 847-867.

Donlan, R.M. (2001). Biofilms and Device-Associated Infections. *Emerging Infectious Diseases*, 7 (2), pp. 277-281.

Donlan, R.M., Costerton, W. (2002). Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 15 (2), pp. 167 -193.

Dowd, S. E., Wolcott, R. D., Sun, Y., *et al.* (2008). Polymicrobial nature of chronic diabetic foot ulcer biofilm infections determined using bacterial tag encoded FLX amplicon pyrosequencing (bTEFAP). *Microbiome of Diabetic Ulcers*, 3(10), pp. 3326.

Flemming, H.C., Wingender, J., Szewzyk, U. *et al.* (2016). Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews*. 14, pp. 563-575.

Fonseca, A.P., Extremina, C. *et al.* (2004). Effect of subinhibitory concentration of piperacillin/ tazobactam on *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Medical Microbiology*, 53, pp. 903-910.

Fonseca, A. P., Sousa, J. C., Tenreiro, R., *et al.* (2006). *Pseudomonas aeruginosa* as a nosocomial pathogen: epidemiology, virulence, biofilm formation and antimicrobial therapy. *Recent Research Developments in Microbiology*, 10, pp. 97-132.

Fonseca, A. P., Sousa, J. C. (2007). Effect of shear stress on growth, adhesion and biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* with antibiotic-induced morphological changes. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 30 (3), pp. 236-241.

Fonseca, A. P. (2011). Biofilms in wounds: An unsolved problem? *EWMA Journal*, 11(2), pp. 10-23.

Fricks-Lima, J., Hendrickson, C.M., Allgaier, M. *et al.* (2011). Differences in biofilm formation and antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from airways of mechanically ventilated patients and cystic fibrosis patients. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 37(4), pp. 309-315.

Ganesh, K., Sinha, M., Mathew-Steiner, S.S., *et al.* (2014). Chronic Wound Biofilm Model. *Advances in Wound Care*, 4(7), pp. 382-388.

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

Hall-Stoodley, L., Stoodley, P., Kathju, S., *et al.* (2012). Towards diagnostic guidelines for biofilm-associated infections. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 65(2), pp. 127-145.

He, N., Hu, J., Liu, H., *et al.* (2011). Enhancement of vancomycin activity against biofilms by using ultrasound-targeted microbubble destruction. *Antimicrob Agents Chemother*,

55(11), pp. 5331–5337.

Hengzhuang, W., Wu, H., Ciofu, O., *et al.* (2011). Pharmacokinetics/ pharmacodynamics of colistin and imipenem on mucoid and nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*, 55(9), pp. 4469–4474.

Henriques, A., Vasconcelos, C., Cerca, N. (2013). A importância dos biofilmes nas infeções nasocomiais – O Estado de Arte. *Arquivos de Medicina*, 27 (1), pp. 27-36.

Herrmann, G., Yang, L., Wu, H. *et al.* (2010). Colistin-Tobramycin Combinations Are Superior to Monotherapy Concerning the Killing of Biofilm *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Infectious Diseases*, 202 (10), pp. 1585-1592.

Høiby N., Ciofu O., Johansen HK., *et al.* (2011) The clinical impact of bacterial biofilms. *International Journal of Oral Science*, 3(2), pp. 55–65.

Høiby, N., Bjarnsholt, T., Moser, C., *et al.* (2015). ESCMID guideline for the diagnosis and treatment of biofilm infections 2014. *Clinical Microbiology and Infection*, 21, pp. S1-S25.

Iwase T., Uehara Y., Shinji H. *et al.* (2010) Staphylococcus epidermidis Esp inhibits Staphylococcus aureus biofilm formation and nasal colonization. *Nature*. 465(7296), pp. 346–349.

Jamal, M. A., Rosenblatt, J.S., Hachem, R. Y. *et al.* (2014). Prevention of Biofilm Colonization by Gram-Negative Bacteria on Minocycline-Rifampin-Impregnated Catheters Sequentially Coated with Chlorhexidine. *Journals - American Society for Microbiology*, 58 (2), pp. 1179-1182.

Jerez, L. (2015). Métodos de diagnóstico para la identificación de biofilm en heridas crónicas. Revisión sistemática. GENEAL UPP.

Kaplan, J.B., Ragunath, C., Ramasubbu, N. *et al.* (2003). Detachment of *Actino- bacillus*

actinomycetemcomitans biofilm cells by an endogenous beta-hexosaminidase activity. *Journal of Bacteriology*, 185, pp. 4693-4698.

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

Koo, H., Allan, R.N., Howlin, R. P. *et al.* (2017). Targeting microbial biofilms: current and prospective therapeutic strategies. *Nature Reviews: Microbiolog.*

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

Lazar, V. (2011). Quorum sensing in biofilms – how to destroy the bacterial citadels or their cohesion/power?. *Anaerobe*, 17(6), pp. 280-285.

Leeper, D., Assadian, O., Edmiston, C. E. (2015). Approach to chronic wound infections. *British Journal of Dermatology*, 173(2), pp. 351-358.

Magalhães, J. (2011). Importância da formação de biofilmes nas infecções associadas a próteses ortopédicas. *Universidade Fernando Pessoa*.

Mann, E.E., Kelly, C. R., Blaise, R. B. *et al.* (2009). Modulation of eDNA release and degradation affects *Staphylococcus aureus* biofilm maturation. *PLoS One*, 4, pp. 1-12.

Marcia, M. D., Rojo-Molinero, E., Oliver, A. (2014). Antimicrobial susceptibility testing in biofilm-growing bacteria. *Clinical Microbiology and Infection*, 20 (10), pp. 981-990.

Menoita, E., Santos, V., Testas, C. *et al.* (2012). Biofilmes: Conhecer a Entidade. *Journal of Aging and Innovation*, 1 (3).

Metcalf, D. G., Bowler, P. G., Hurlow, J. (2016). A clinical algorithm for wound biofilm identification. *Journal of Wound Care*, 23(3), pp. 137-142.

Mulla, S., Kumar, A., Rajdev, S. (2016). Comparison of MIC with MBEC Assay for *in Vitro* Antimicrobial Susceptibility Testing in Biofilm Forming Clinical Bacterial Isolates. *Advances in Microbiology*, 6, pp. 73-78.

Omar, A., Wright, J.B., Schultz. *et al.* (2017) Microbial Biofilms and Chronic Wounds. *Microorganisms*, 5 (1).

Pasternak, J. (2012). New methods of microbiological identification using MALDI-TOF. *SciELO*, 10(1), pp. 118-119.

Pedro, I., Saraiva, S. (2012). Nursing Intervention for Biofilm management en Complex Wounds. *Journal of Aging and Innovation*, 1(6), pp. 78-88.

Percival, S. L., Thomas, J. G., Williams D.W. (2010). Biofilms and bacterial imbalances in chronic wounds: anti-Koch. *International Wound Journal*, 7, pp. 169-175.

Percival, S. L., Vuotto, C., Donelli, G., *et al.* (2015b). Biofilms and wounds: an identification algorithm and potential treatment options. *Advances in Wound Care*, 4(7), pp. 389-397.

Pinto, G. (2016). Biofilmes e Feridas Crónicas. Tese de Mestrado, Universidade Fernando Pessoa, Portugal.

Pinto, G., Fonseca, A. F. (2018). Biofilmes e Feridas Crónicas: Um potencial algoritmo. *Journal of tissue regeneration & healing*.

Prakash, B., Veeregowda, B.M. and Krishnappa, G. (2003). Biofilms: A survival strategy of bacteria. *Current Science*, 85(9), pp.1299-1306.

Pratt, L.A., Kolter, R. (1999). Genetic analyses of bacterial biofilm formation. *Current Opinion in Microbiology*, 2, pp. 598-603.

Ronaghi, M. (2001). Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. *Genome Research*, 11(1), pp. 3-11.

Roy, R., Tiwari, M. *et al.* (2018). Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. *Virulence*, 9(1), pp.522-554.

Saldanha. J. (2013). Emprego de nanopartículas em estratégias de prevenção e tratamento de infecções relacionadas à formação de biofilmes bacterianos. *Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro*.

Santos, V., Marques, J., Santos, A., *et al.* (2012a). Identification and treatment of infection on complex wounds. *Journal of Aging and Innovation*, 1(2), pp. 48-64.

Santos, V., Santos, A., Menoita, E. (2013) Wound Biofilm Approach: Case Studies. *Journal of Aging and Innovation*, 2(1), pp. 76-96.

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.

Sing, P.K., Parsek, M.R. *et al.* (2002) A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development. *Nature*, 417, pp. 552-555.

Stoodley, P., Wilson, S., Hall, Stoodley, L. *et al.* (2001). Growth and Detachment of Cell Clusters from Mature Mixed-Species Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(12), pp. 5608-5613.

Stoodley, P.; Sauer, K.; Davies, D.G., Costerton, J.W. (2002). Biofilms as Complex Differentiated Communities. *Annual Review of Microbiology*, 56, pp. 187-209.

Sun, F., Qu, F., Ling, Y., *et al.* (2013). Biofilm-associated infections: antibiotic resistance and novel therapeutic strategies. *Future Microbiology*, 8(7), pp. 877-886.

Trentin, D., Giordani, R. B., Macedo, A. J. (2013). Biofilmes bacterianos patogénicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate 1. *Revista Liberato*, 14(22), pp. 213-236.

Wu, H., Lee, B., Yang, L. *et al.*, (2011) Effects of ginseng on *Pseudomonas aeruginosa* motility and biofilm formation. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 62(1), pp. 49–56.

Wu, H., Moser, C., Yang, HZ. *et al.*, (2014) Strategies for combating bacterial biofilm infections. *International Journal of Oral Science*, 65(7), pp. 1-7.