

# **INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ**

## **MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

### **INFEÇÕES ASSOCIADAS A BIOFILMES BACTERIANOS: DESAFIOS NO DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO**

Trabalho submetido por  
**Marta Raquel Faustino Lourenço**  
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

**Novembro de 2024**



# **INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ**

## **MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

### **INFEÇÕES ASSOCIADAS A BIOFILMES BACTERIANOS: DESAFIOS NO DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO**

Trabalho submetido por  
**Marta Raquel Faustino Lourenço**  
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por  
**Prof. Doutora Lucinda Bessa**

**Novembro de 2024**



## **Agradecimentos**

À minha orientadora, Prof. Doutora Lucinda Bessa, pela sua orientação incansável, pelo conhecimento partilhado e pelo apoio constante ao longo deste percurso. A sua dedicação e rigor foram essenciais para a concretização deste trabalho.

Aos meus pais, os maiores pilares da minha vida, agradeço por sempre acreditarem em mim mesmo quando eu não acreditei. Sem o vosso incentivo constante e a vossa confiança, nada disto teria sido possível.

Ao meu irmão Miguel, a minha maior inspiração, obrigada por seres sempre o meu maior exemplo e nunca me deixares desistir.

Aos meus avós, aos presentes, seja em memória ou ao meu lado, agradeço com todo o carinho pelo amor, pela sabedoria e pelos valores que sempre me transmitiram. A vossa força e exemplo de vida foram e continuarão a ser uma inspiração em cada passo que dou.

Ao Alexandre pela paciência e apoio incondicional em cada etapa deste percurso. A tua presença constante, compreensão e incentivo foram fundamentais para superar todos os desafios ao longo desta jornada.

Aos meus amigos Afonso, Alexandra, Catarina, Juliana e Nuno, os meus companheiros de todas as horas, agradeço por cada momento partilhado, pelas risadas, pelo apoio nos momentos mais desafiantes e pela amizade inestimável. Sem vocês estes cinco anos não teriam sido o mesmo.

Aos meus amigos Diogo, Mafalda e Margarida sou profundamente grata pelo apoio, pelas conversas e pela amizade constante, que me ajudaram a manter a motivação ao longo deste caminho.

A todos os professores que me acompanharam neste percurso académico deixo o meu sincero agradecimento pela dedicação e pelo conhecimento transmitido. Em especial ao Professor João Aguiar por ser um modelo que levarei comigo.

Por último quero agradecer àquela que foi a minha segunda casa durante os últimos cinco anos. Obrigada, Egas Moniz.



## Resumo

**Introdução:** As infecções bacterianas associadas a biofilmes representam um grande desafio na prática clínica devido à elevada resistência que estas comunidades bacterianas apresentam a tratamentos antimicrobianos convencionais. Os biofilmes bacterianos são formados por bactérias organizadas em comunidade, protegidas por uma matriz extracelular que lhes confere resistência não só aos antibióticos, mas também aos mecanismos de defesa do sistema imunitário. Patogénios como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, e *Escherichia coli* são frequentemente implicados em infeções relacionadas a biofilmes, associadas a dispositivos médicos, feridas crónicas e outras condições de saúde. Devido à ineficácia dos tratamentos tradicionais, há uma necessidade urgente de desenvolver novas abordagens terapêuticas que consigam combater eficazmente as infeções relacionadas a biofilmes.

**Objetivos:** Realizar uma revisão atualizada sobre: (1) os tipos de infeções associadas a biofilmes, (2) a relevância clínica destas infeções, (3) as espécies bacterianas envolvidas em infeções humanas relacionadas com biofilmes e (4) os métodos de diagnóstico e tratamento disponíveis para estas infeções.

**Método:** Esta revisão narrativa foi desenvolvida através de uma pesquisa bibliográfica realizada em várias bases de dados, incluindo PUBMED, Scopus e Web of Science. Foram considerados principalmente artigos publicados entre 2014 e 2024.

**Conclusão:** Atualmente, o tratamento de infeções bacterianas associadas a biofilmes enfrenta desafios significativos devido à resistência que estas comunidades bacterianas apresentam aos tratamentos antibióticos convencionais. Apesar do desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas, como por exemplo a terapia fágica, a aplicação clínica das mesmas é ainda limitada. É essencial promover investigação contínua e estratégias inovadoras quer de diagnóstico quer para aumentar a eficácia no combate a estas infeções, que representam uma ameaça crescente à saúde pública.

**Palavras-chave:** Biofilmes bacterianos, infeções humanas associadas a biofilmes, diagnóstico, tratamento.



## **Abstract**

**Introduction:** Bacterial biofilm-associated infections present a major challenge in clinical practice due to the high resistance these bacterial communities exhibit against conventional antimicrobial treatments. Bacterial biofilms are formed by organized bacterial cells encased in an extracellular matrix, which grants them resistance not only to antibiotics but also to the immune system's defence mechanisms. Pathogens such as *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Escherichia coli* are frequently implicated in biofilm-related infections associated with medical devices, chronic wounds, and other health conditions. The inefficacy of traditional treatments has created an urgent need to develop new therapeutic approaches capable of effectively combating biofilm-related infections.

**Objectives:** To conduct an updated review on (1) the types of biofilm-associated infections, (2) the clinical relevance of these infections, (3) the bacterial species involved in human biofilm-related infections, and (4) the available methods for diagnosing and treating these infections.

**Method:** This narrative review was developed through a literature search conducted across multiple databases, including PUBMED, Scopus, and Web of Science. Articles published primarily between 2014 and 2024 were considered.

**Conclusion:** Currently, the treatment of biofilm-associated infections faces significant challenges due to the resistance these bacterial communities exhibit against conventional antibiotic treatments. Although new therapeutic approaches, such as phage therapy, are under development, their clinical application remains limited. Continuous research and innovative strategies are essential to facilitate the diagnosis and to enhance the effectiveness in combating these infections, which pose a growing public health threat.

**Keywords:** Bacterial biofilms, human biofilm-associated infections, diagnosis, treatment.



## ÍNDICE

<b>I. INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>II. DESENVOLVIMENTO</b> .....	15
<b>1. Biofilmes</b> .....	15
1.1. Formação do biofilme bacteriano .....	16
1.2. Fatores que influenciam a formação de biofilmes.....	19
1.3. Composição dos biofilmes.....	19
1.4. <i>Quorum sensing</i> (QS) na formação de biofilmes .....	21
1.4.1. QS no biofilme de <i>P. aeruginosa</i> .....	21
1.4.2. QS no biofilme de <i>S. aureus</i> .....	22
<b>2. Bactérias formadoras de biofilmes com relevância clínica</b> .....	24
2.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	24
2.2. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	27
<b>3. Infecções associadas biofilmes</b> .....	29
3.1. Infecções do trato urinário.....	30
3.2. Feridas crônicas .....	31
3.3. Infecções relacionadas com o trato respiratório .....	32
3.4. Infecções associadas a dispositivos médicos.....	33
<b>4. Desafios no diagnóstico de infecções por biofilmes</b> .....	36
4.1. Métodos de diagnóstico recomendados .....	36
4.1.1. Técnicas de microscopia.....	37
4.1.2. Biomarcadores .....	38
4.1.3. Métodos baseados em culturas .....	39
4.1.3.1. Método de formação de biofilme em placa de 96-poços e quantificação do biofilme formado pelo método do cristal violeta.....	39
4.1.3.2. Método do agar vermelho congo (CRA).....	40
4.1.4. Métodos moleculares .....	40
4.1.4.1. Reação em cadeia da polimerase .....	40
4.2. Métodos em desenvolvimento .....	42
4.2.1. Espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE).....	42
4.2.2. Superfícies antiaderentes .....	43
<b>5. Abordagens terapêuticas e obstáculos no combate aos biofilmes</b> .....	43
5.1. Tratamentos convencionais baseados em diretrizes clínicas .....	43
5.2. Resistência antimicrobiana .....	45

5.3. Novas estratégias de erradicação de biofilmes .....	46
<b>III. CONCLUSÃO.....</b>	<b>49</b>
<b>IV. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>51</b>

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1-</b> Infecções associadas a biofilmes e organismos responsáveis (Mirzaei, et al., 2020). .....	29
--	----



## Índice de Figuras

<b>Figura 1-</b> Esquema da Formação de biofilmes. Adaptado de (Condinho et al., 2023)...	16
<b>Figura 2-</b> Heterogeneidade dos biofilmes. Adaptado de (Flemming et al., 2016).....	18
<b>Figura 3-</b> Quorum sensing no biofilme de <i>P. aeruginosa</i> . Adaptado de (Lee et al., 2015). .....	21
<b>Figura 4-</b> Esquema do sistema <i>Agr</i> em <i>S. aureus</i> . Adaptado de (Quave et al., 2014)...	23
<b>Figura 5-</b> Diferentes tipos de infecções causadas por <i>P. aeruginosa</i> . Adaptado de (Tuon et al., 2022).....	25
<b>Figura 6-</b> Genes e as suas funções na formação de biofilme por <i>S. aureus</i> . Adaptado de (Idrees et al., 2021). .....	28



## Lista de abreviaturas

Agr	<i>Accessory Gene Regulator</i>
AI	Autoindutores
AI-2	Péptido autoindutor-2
AIP	<i>Autoinducing Peptide</i>
CDC	<i>Center for Disease Control</i>
CFTR	Regulador da condutância transmembranar da fibrose quística
CLSM	Microscopia confocal de varrimento a laser
CRA	Agar vermelho congo
CVC	Cateteres Venosos Centrais
CWA	Proteínas ancoradas à parede celular
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EI	Endocardite Infeciosa
EIE	Espectroscopia de Impedância Eletroquímica
EPS	Matriz extracelular polimérica
ESCMID	Sociedade Europeia de Doenças Infecciosas e Microbiologia Clínica
ESEM	Microscopia eletrónica de varrimento ambiental
ETs	Toxinas exfoliativas
EVP	Endocardite da Válvula Cardíaca Protética
HSL	N-acil homoserina
ITU	Infeção do Trato Urinário
ITU-AC	Infeção do Trato Urinário Associada a Cateteres
MDRPA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> multirresistente
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina
MSCRAMM	Componentes de superfície microbiana que reconhecem moléculas da matriz adesiva
NEAT	Transportadores de ferro
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PFTs	Toxinas formadoras de poros
PIA	Adesina polissacarídica intercelular
PMA	Propidíio de monoazida
PNAG	Poly- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6) -N-acetilglucosamina

PQS	Molécula sinalizadora de quinolona de <i>Pseudomonas</i>
PSMs	Modulinas solúveis em fenol
QS	<i>Quorum sensing</i>
Rot	Repressor de toxinas
SAgs	Superantígenos
SEM	Microscopia eletrónica de varrimento
T2SS	Sistema de secreção tipo II
TEM	Microscopia eletrónica de transmissão
UPEC	<i>Escherichia coli</i> uropatogénica

## I. INTRODUÇÃO

Biofilmes bacterianos são comunidades complexas e estruturadas de bactérias, que normalmente estão aderidas a uma superfície e que podem ter um impacto benéfico ou prejudicial na natureza, na medicina e na indústria (Yan et al., 2019). Após colonização inicial da superfície, segue-se a produção de uma matriz polissacarídica extracelular que envolve as bactérias e as protege. No interior do biofilme maduro, as bactérias adaptam-se à limitação de nutrientes e diminuição de oxigênio através de alterações no metabolismo, expressão genética e produção de proteínas, o que pode resultar numa taxa diminuída de divisão celular, estas adaptações permitem maior resistência das bactérias à terapêutica antimicrobiana (Vestby et al., 2020).

O diagnóstico de infecções associadas a biofilmes permanece um desafio, uma vez que os sinais e sintomas apresentados pelos pacientes são inespecíficos, e não há um protocolo de diagnóstico estabelecido na prática clínica. Além disso, muitas das metodologias disponíveis são dispendiosas, demoradas e exigem profissionais altamente qualificados, o que limita a sua aplicabilidade na rotina clínica (Jamal et al., 2018; Silva et al., 2021a). Além disso, os testes de suscetibilidade antimicrobiana são normalmente realizados em bactérias na forma planctônica, o que não reflete a realidade clínica das infecções associadas a biofilmes, uma vez que as bactérias organizadas em biofilme são intrinsecamente mais resistentes aos antibióticos do que as bactérias planctônicas (Ferrer et al., 2017). Conscientes desses desafios, em 2014, um grupo de especialistas pertencentes ao Grupo de Estudo de Biofilmes da Sociedade Europeia de Doenças Infeciosas e Microbiologia Clínica (ESCMID), elaboram um documento de diretrizes para auxiliar no diagnóstico e tratamento de infecções associadas a biofilmes (Høiby et al., 2015).

Para além do diagnóstico, também o tratamento destas infecções é igualmente complexo. Dadas as características do biofilme, onde as bactérias estão agregadas e envolvidas na matriz extracelular por elas produzida, fala-se em tolerância dos biofilmes aos antibióticos (Vestby et al., 2020). Portanto, essa tolerância está relacionada com vários fatores, incluindo fatores físicos, fisiológicos e determinantes genéticos. Assim, as células dentro do biofilme sobrevivem ao tratamento antimicrobiano e podem perpetuar a infecção uma vez cessado o tratamento (Ciofu et al., 2019).

O objetivo desta monografia foi fazer uma revisão atualizada 1) do tipo de infecções associadas a biofilmes, 2) da contextualização da sua relevância clínica, 3) das espécies bacterianas mais desafiantes envolvidas nas infecções humanas associadas a biofilmes, e 4) dos métodos para o seu diagnóstico e tratamento.

Esta revisão narrativa foi feita com recurso a uma pesquisa bibliográfica em várias bases de dados, nomeadamente no PUBMED, Scopus and Web Of Science. Foram considerados maioritariamente artigos publicados entre 2014 e 2024. Palavras-chave para a pesquisa incluíram: biofilmes bacterianos, infecções humanas associadas a biofilmes, diagnóstico, tratamento.

## II. DESENVOLVIMENTO

### 1. Biofilmes

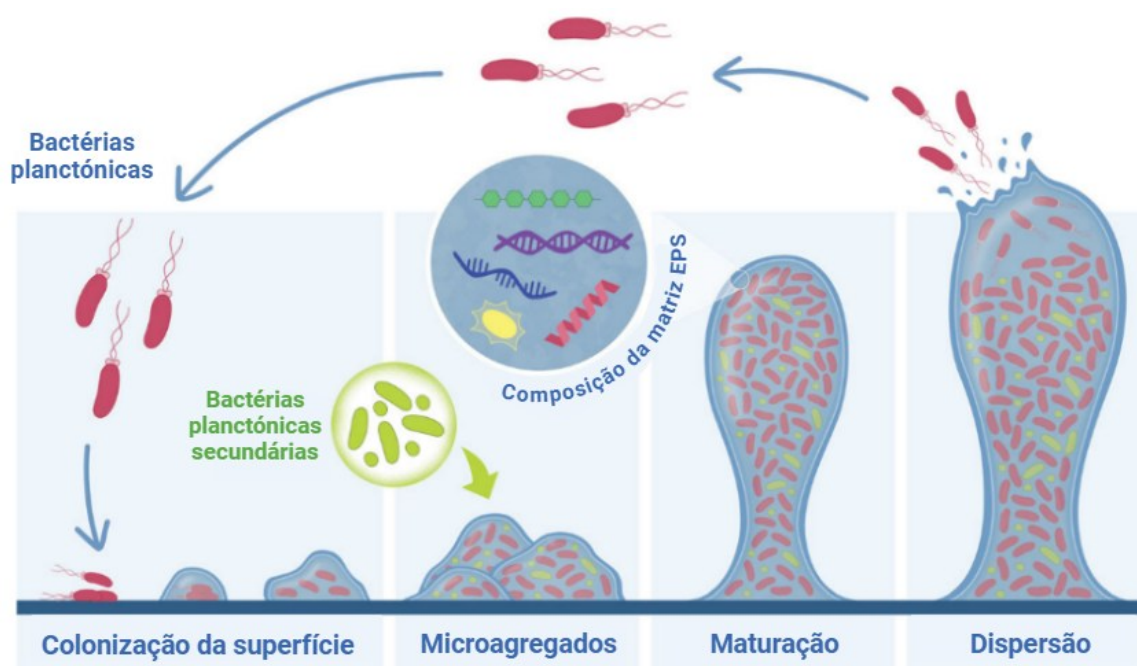
O conceito de biofilme tem como base a pesquisa de Anthony van Leeuwenhoek que no século XVII com recurso a um microscópio primitivo foi capaz de observar agregados de células provenientes dos seus próprios dentes e mucosa oral (Høiby, 2014). Mas foi só mais tarde na década de 1970 que se começou a desenvolver a definição de biofilme através da análise de secreções de pacientes com fibrose quística que acabavam por morrer devido a infeções crónicas por *Pseudomonas aeruginosa* (Rabin et al., 2015).

Os biofilmes microbianos são comunidades de estrutura complexa, compostas por microrganismos tais como bactérias, vírus, fungos e/ou arqueas, que se encontram embebidos numa matriz extracelular polimérica (EPS) (Sharma et al., 2023; Bamford et al., 2023). A sua formação acontece após a colonização inicial de uma superfície (biótica ou abiótica) por alguns microrganismos, segue-se a produção da matriz extracelular de substâncias poliméricas (EPS), que é constituída por polissacarídeos, proteínas, DNA extracelular, lípidos e outras biomoléculas e envolve as bactérias, protegendo-as (Vestby et al., 2020). Dada a relevância clínica dos biofilmes bacterianos, daqui em diante serão apenas abordados os biofilmes bacterianos e às infeções associadas aos mesmos.

As bactérias podem ser distinguidas em sésseis e planctónicas. Na colonização inicial bactérias planctónicas, ou seja, livres, ligam-se irreversivelmente a uma superfície, multiplicam-se e tornam-se sésseis, as células constituintes do biofilme (Sharma et al., 2023).

### 1.1. Formação do biofilme bacteriano

A formação de um biofilme bacteriano é um processo faseado: 1º colonização da superfície, 2º formação de micro-agregados, 3º maturação e por último, 4º dispersão (Jamal et al., 2018). As fases de formação de um biofilme estão ilustradas na Figura 1.



**Figura 1**- Esquema da Formação de biofilmes. Adaptado de (Condinho et al., 2023). O processo começa com a colonização da superfície. Posteriormente, o biofilme cresce dentro de uma matriz, amadurece, e, quando as condições ambientais deixam de ser favoráveis, ocorre a dispersão permitindo colonizar novas superfícies. A matriz extracelular (EPS) do biofilme é composta por polissacarídeos (verde), eDNA (roxo), eRNA (azul), proteínas (vermelho) e moléculas sinalizadoras (amarelo).

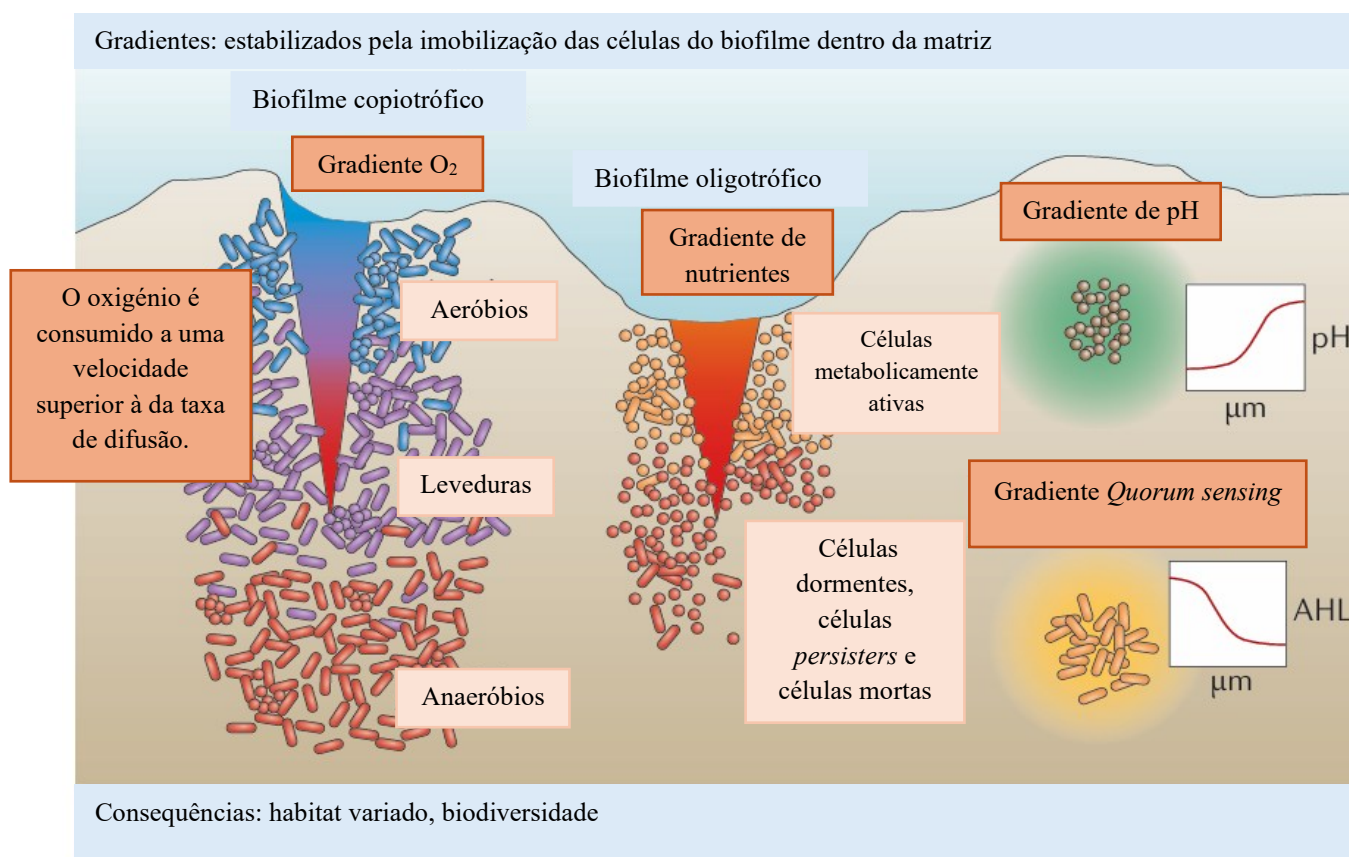
Este processo é desencadeado por bactérias planctônicas, que na sua forma livre encontram uma superfície à qual aderem através de alterações fisiológicas, metabólicas e fenotípicas (Rather et al., 2021). Estabelecem-se interações electrostáticas e forças de van der Waals, entre outras, e é a combinação destas forças que permite que as bactérias também se liguem entre si e formem uma monocamada (Sharma et al., 2023).

A adesão é despoletada pela formação de ligações reversíveis entre as bactérias e a superfície, e que posteriormente se alteram, tornando-se irreversíveis, aumentando assim a resistência a fatores físicos extrínsecos (Banerjee et al., 2015; S. Sharma et al., 2023). A presença de flagelos, fímbrias, e proteínas de adesão específicas podem facilitar a etapa de adesão. A molécula monofosfato de guanosina cíclico diguanilato (c-di-GMP) é

essencial na sinalização bacteriana intracelular, pois restringe a motilidade dos flagelos e também aumenta a produção de matriz do biofilme; a concentração desta molécula aumenta com o número de bactérias que aderem à superfície (Jamal et al., 2018).

De seguida, inicia-se a multiplicação e agregação das bactérias dentro da matriz EPS produzida pelos mesmos que leva à formação de microagregados. Os agregados bacterianos num biofilme geralmente funcionam como micro-comunidades que se coordenam em vários aspetos, nomeadamente na troca de substratos, na distribuição de produtos metabólicos importantes e na excreção de resíduos (Bjarnsholt et al., 2013).

A etapa de maturação resulta da agregação das microagregados, o biofilme maduro é composto por três camadas, a mais interior é a camada reguladora, a camada base e a camada mais exterior onde se encontram bactérias já planctónicas (Zhao et al., 2017). Assim a estrutura tridimensional do biofilme apresenta forma de “cogumelo” ou “torre”, onde as bactérias se reorganizam de acordo com o tipo de metabolismo (Figura 2) (Rabin et al., 2015; Flemming et al., 2016).



**Figura 2-** Heterogeneidade dos biofilmes. Adaptado de (Flemming et al., 2016). A matriz (EPS) dos biofilmes cria gradientes estáveis que favorecem habitats localizados. Nos biofilmes, a estratificação dos organismos ocorre com base na disponibilidade de oxigênio e nutrientes. Nas camadas mais internas há depleção de oxigênio e nutrientes, o que induz estados de crescimento lento ou morte celular. Além disso, gradientes de pH e moléculas sinalizadoras variam de acordo com a distância das células produtoras.

Finalmente, a última etapa da formação de um biofilme bacteriano é a dispersão, que ocorre após a rápida proliferação de células dentro do biofilme, em que algumas células bacterianas se começam a desprender do biofilme, retomando ao estado planctônico, para colonizar novas superfícies (Jamal et al., 2018). A dispersão pode ocorrer por exemplo, por falta de nutrientes, competição ou superpopulação do biofilme, com a libertação de bactérias para o meio, que se podem propagar e começar um novo ciclo de formação de novos biofilmes, mas ou menos próximos do que lhe deu origem (Rabin et al., 2015).

## 1.2. Fatores que influenciam a formação de biofilmes

Quando um biofilme coloniza uma superfície, as características dessa superfície, como a interface do suporte, propriedades eletrostáticas, hidrofobicidade, rugosidade e morfologia, influenciam significativamente a fixação das células microbianas (Zhao et al., 2017). Outros fatores influenciam também a adesão bacteriana, nomeadamente a temperatura, o pH, fatores ambientais, a disponibilidade de nutrientes e as condições hidrodinâmicas (Oder et al., 2017).

Num estudo de Zhu e colaboradores (Zhu et al., 2015), foram usadas 3 espécies, *P. aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, para investigar a adesão bacteriana em superfícies com diferentes cargas. Os resultados mostraram que a adesão foi maior em superfícies com carga positiva em comparação com superfícies neutras ou com carga negativa. Esse fenómeno ocorre devido à carga negativa das membranas celulares bacterianas, que, através de interações eletrostáticas, favorecem a adesão às superfícies carregadas positivamente.

## 1.3. Composição dos biofilmes

A estrutura do biofilme é conseguida e transformada ao longo do tempo por uma miríade de fatores. Como por exemplo, o tipo de microrganismo que forma o biofilme (a espécie e se é mono-espécie ou multi-espécies), as características da superfície, interação entre as bactérias e propriedades físico-químicas do meio exterior (Schuster et al., 2014).

Algumas células bacterianas no interior do biofilme diferenciam-se das restantes. Essa subpopulação de células designadas de persistentes (*persisters*) constituem um mecanismo de sobrevivência utilizado por bactérias durante a fase de crescimento exponencial, em resposta a condições ambientais adversas, como presença de antibióticos, pH ácido, espécies reativas de oxigénio, falta de nutrientes (Miyae et al., 2018; Niu et al., 2024). Estas células demonstram tolerância em vez de resistência, diferenciando-se fenotipicamente, mas não genotipicamente das restantes bactérias (Fisher et al., 2017). Nos últimos anos, o reconhecimento do papel das células *persisters* tem crescido, especialmente no contexto da persistência e recorrência de infeções bacterianas, mesmo após a utilização de terapias antimicrobianas (Fisher et al., 2017).

Estas células têm também a capacidade de entrar num estado de dormência, onde a sua atividade metabólica é drasticamente reduzida, permitindo-lhes sobreviver à exposição aos antibióticos (Kapoor et al., 2017; Wainwright et al., 2021).

Quanto à carga iónica o biofilme, este pode ter uma carga positiva quando na presença de iões como  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ , mas também pode ser neutro ou polianiónico como é o caso da matriz EPS produzida pelas bactérias Gram-negativas (Vandana et al., 2021).

A matriz EPS que envolve as bactérias consiste maioritariamente em polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos como o DNA extracelular (eDNA) e glicopéptidos (Schulze et al., 2021). O volume do biofilme é constituído por 5-35% de microrganismos, sendo o resto ocupado pela matriz extracelular (Jamal et al., 2018).

Os polissacarídeos desempenham funções estruturais e de proteção influenciando a morfologia dos agregados, são produzidos pelas bactérias para aderir às superfícies, e conferir proteção contra os agentes antimicrobianos, além de permitirem também o acumular de outros nutrientes (Limoli et al., 2015). Vários exopolissacarídeos, tais como o alginato, xantana e ácido colánico, são exopolissacarídeos polianiónicos. Mas exopolissacarídeos policationicos também existem, nomeadamente PNAG (Poly- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-N-acetilglucosamina) e Pel (Balducci et al., 2023).

O eDNA, comumente encontrado na matriz extracelular de um biofilme, é indispensável na estrutura e integridade da organização do biofilme. O eDNA é uma molécula bastante versátil, uma vez que está envolvido na mediação da transferência genética horizontal, na captação de catiões como o  $\text{Mg}^{2+}$  do meio, e ainda facilita a adesão de bactérias a superfícies em que a aderência é menor, tal como, superfícies abióticas e hidrofóbicas (Campoccia et al., 2021).

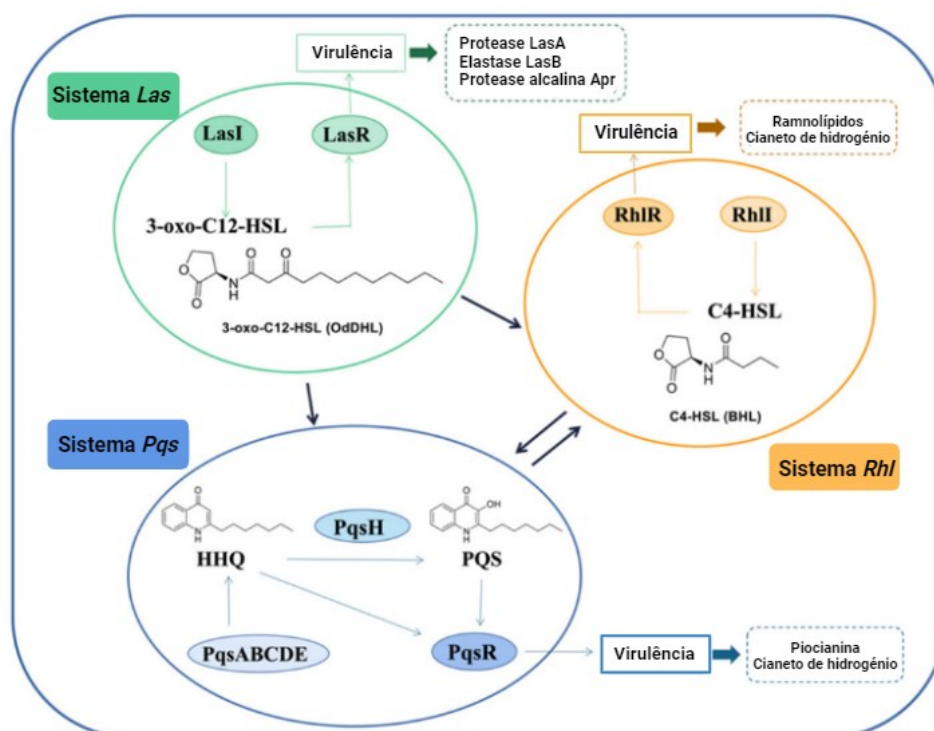
Primeiramente descobriu-se que o eDNA seria proveniente da lise celular, fazendo dele um subproduto, contudo, o eDNA é libertado não só aquando da lise celular (incluindo autólise), mas também pela regulação mediada pelo *quorum sensing* (QS) (Rather et al., 2021).

#### 1.4. Quorum sensing (QS) na formação de biofilmes

O QS é um mecanismo que permite a comunicação célula-célula, entre bactérias e envolve a libertação e produção de moléculas denominadas autoindutores (AI) (Kim et al., 2016). Os AI são produzidos pelas bactérias e atuam como sinais químicos, o aumento da densidade populacional bacteriana é diretamente proporcional à concentração de AI. Os principais AI são as lactonas N-acil homoserina (HSL) no caso de bactérias Gram-negativas e o péptido autoindutor-2 (AI-2) nas Gram-positivas (Rather et al., 2021).

##### 1.4.1. QS no biofilme de *P. aeruginosa*

O QS de *P. aeruginosa* é um dos mais estudados e importantes devido à sua elevada patogenicidade, sendo regulado por três sistemas, que se interligam por uma hierarquia: *Las*, *Rhl* e *Pqs* (Figura 3).



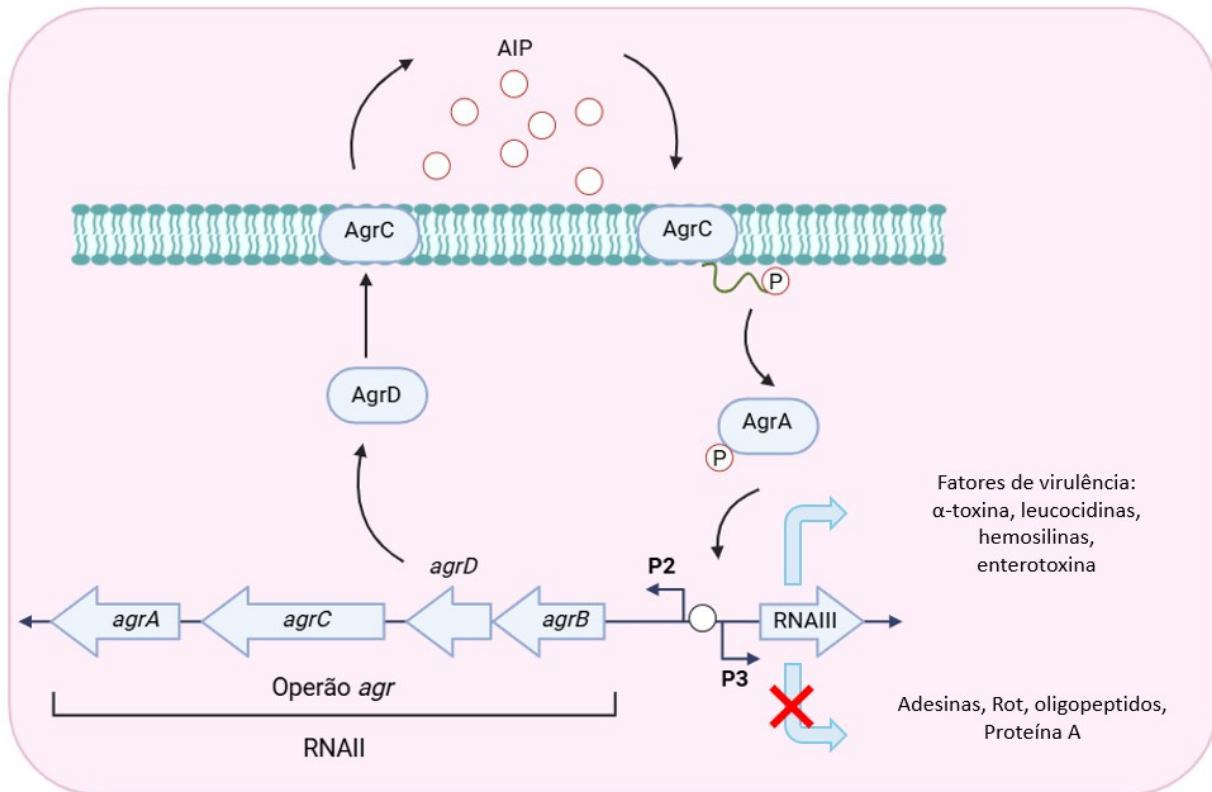
**Figura 3** - Quorum sensing no biofilme de *P. aeruginosa*. Adaptado de (Lee et al., 2015). Os três sistemas principais presentes no QS de *P. aeruginosa*: o sistema Las (verde), Rhl (laranja) e o sistema Pqs (azul), todos associados às moléculas sinalizadoras específicas. O sistema Las ocupa o nível superior na hierarquia influenciando todos os restantes, enquanto o sistema Rhl é regulado pelos sinais dos sistemas Las e Pqs.

A produção da maioria dos fatores de virulência de *P. aeruginosa* depende destes três sistemas de QS interligados (Williams et al., 2009). Os sistemas *Las* e *Rhl* levam à produção de moléculas sinalizadoras HSL, sendo que o sistema *Las* controla o sistema *Rhl*. Um terceiro sistema, o *Pqs*, envolvendo a molécula sinalizadora de quinolona de *Pseudomonas* (PQS), também depende hierarquicamente do *Las* (Lee et al., 2015; Williams et al., 2009).

O QS desempenha um papel crucial na resistência antibiótica dos biofilmes formados por *P. aeruginosa*. De acordo com o estudo conduzido por Hemmati (Hemmati et al., 2024), foi encontrada uma correlação significativa entre a presença de genes de QS e a resistência antibiótica. Em 70,8% dos isolados de *P. aeruginosa* multirresistente (MDRPA), foram identificados os genes associados ao QS, nomeadamente *rhII*, *rhIR*, *lasI* e *lasR*. Além disso, foi observada uma forte relação entre a resistência antibiótica e a capacidade de formação de biofilmes, uma vez que 99% dos isolados de MDRPA eram produtores de biofilmes. Destes, 42,5% eram formadores de biofilmes robustos (Hemmati et al., 2024). Esses resultados destacam a importância do QS na promoção da formação de biofilmes e na proteção das bactérias contra agentes antimicrobianos.

#### 1.4.2. QS no biofilme de *S. aureus*

O sistema principal responsável pelo mecanismo de QS em *S. aureus* é o sistema *agr* (*accessory gene regulator*) (Kavanaugh et al., 2016; Le et al., 2015). Este sistema está codificado no operão *agrBDCA*, que compreende quatro genes e está presente no cromossoma bacteriano (Figura 4). O operão é regulado por dois promotores principais, P2 e P3, que geram dois tipos de RNA primário: RNAII e RNAIII, respetivamente. O RNAII resulta da transcrição dos genes *agrB*, *agrD*, *agrC* e *agrA*. Os genes *agrD* e *agrB* são responsáveis pela produção da molécula sinal do QS denominada AIP (*autoinducing peptide*) (Kavanaugh et al., 2016; Le et al., 2015; Schilcher et al., 2020). AgrD é o precursor da AIP, AgrB é uma endopeptidase de membrana integral responsável por processar AgrD na sua forma ativa. À medida que os níveis de AIP aumentam fora da célula, é ativada a AgrC, e quando se alcança a concentração crítica, é acionada a cascata de transdução (Schilcher et al., 2020; Wang et al., 2016).



**Figura 4-** Esquema do sistema Agr em *S. aureus*. Adaptado de (Quave et al., 2014).

A ativação de AgrC desencadeia a sua autofosforilação e a subsequentemente transferência do grupo fosfato para o regulador de resposta AgrA, iniciando a cascata de transdução de sinal (Kavanaugh & Horswill, 2016; Wang & Muir, 2016). AgrA fosforilado ativa a expressão do RNAIII a partir do promotor P3, que regula a produção de fatores de virulência, como exotoxinas e exoenzimas, e inibe a tradução do repressor de toxinas (Rot), intensificando ainda mais a virulência bacteriana (Schilcher et al., 2020; Sionov et al., 2022; Vinodhini et al., 2024).

*S. aureus* é altamente patogénico devido à sua diversidade de fatores de virulência. As principais toxinas de *S. aureus* podem ser divididas em: toxinas formadoras de poros (PFTs), toxinas exfoliativas (ETs) e superantígenos (SAGs). As toxinas formadoras de poros podem ainda ser categorizadas em quatro tipos: hemolisina- $\alpha$  (Hla ou  $\alpha$ -toxina), hemolisina- $\beta$ , leucotoxinas (Luk) e modulinas solúveis em fenol (PSMs) como  $\delta$ -toxina (Oliveira et al., 2018; Tam et al., 2019).

O outro fator de virulência são as leucocidinas, que atacam principalmente leucócitos e os moduladores da resposta imunitária do hospedeiro (Alonzo et al., 2014).

O RNAIII, a molécula efetora do sistema *agr*, reprime o Rot, um repressor de toxinas que se liga às regiões promotoras de genes de toxinas, inibindo sua expressão (Touchette et al., 2015). Ao inibir Rot, RNAIII permite a ativação de toxinas, promovendo a virulência bacteriana (Quave et al., 2014).

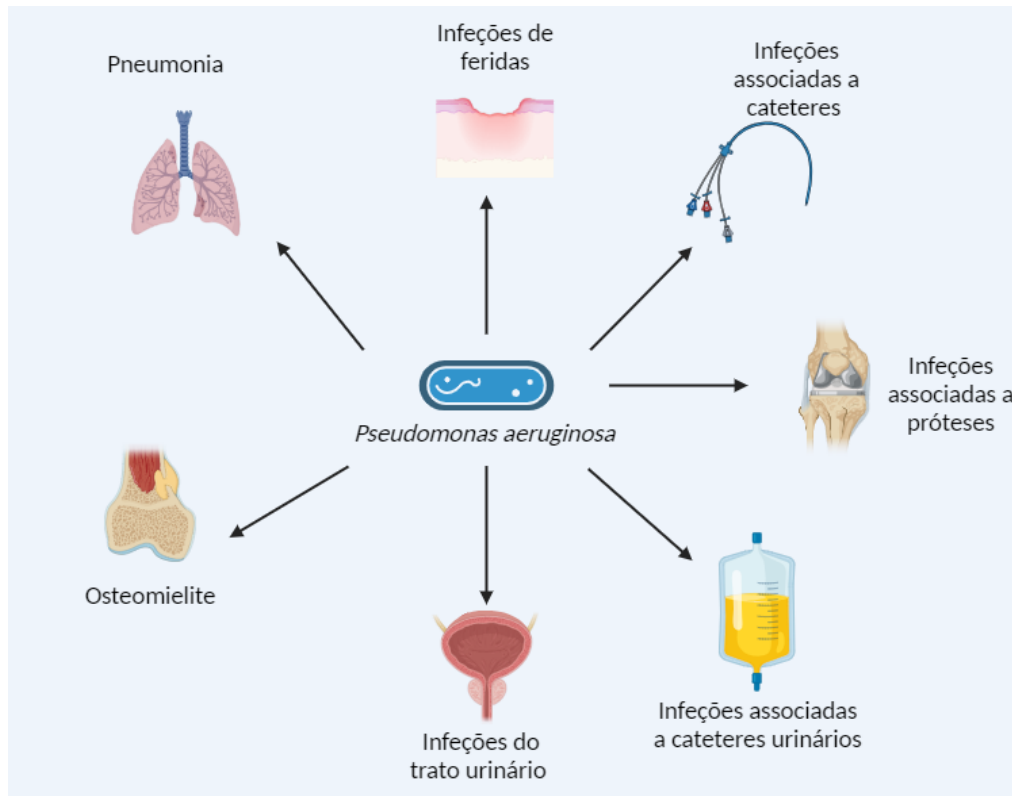
## **2. Bactérias formadoras de biofilmes com relevância clínica**

As bactérias que mais frequentemente causam infecções associadas a biofilmes são: *P. aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Streptococcus viridans*, *S. aureus*, e *Enterococcus faecalis* (Chen et al., 2013).

Em várias situações, a infecção desenvolve-se porque os dispositivos médicos na cirurgia foram contaminados por, por exemplo, *S. aureus*, cuja fonte pode ter sido a pele do paciente ou dos profissionais de saúde (Pietrocola et al., 2022). Estas bactérias não são só encontradas em superfícies de dispositivos médicos. *P. aeruginosa* e *S. aureus* são as duas bactérias mais encontradas no biofilme associado a feridas crônicas (Serra et al., 2015).

### *2.1. Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria Gram-negativa encontrada em vários ambientes, tais como, água, plantas, animais e solo (Streeter et al., 2016). Esta bactéria representa atualmente uma ameaça à saúde pública devido à propagação de estirpes resistentes a antimicrobianos e com capacidade de formar biofilme, que causam vários tipos de infecções (Figura 5), especialmente em imunodeprimidos. *P. aeruginosa* está entre as espécies bacterianas mais isoladas em infecções nosocomiais e também em feridas crônicas (Mantero et al., 2017).



**Figura 5-** Diferentes tipos de infecções causadas por *P. aeruginosa*. Adaptado de (Tuon et al., 2022).

*P. aeruginosa* é capaz de formar biofilmes, sendo o processo faseado e idêntico aos descrito em cima para os biofilmes bacterianos (Vetrivel et al., 2021). Esta bactéria dispõe de uma série de fatores de virulência, nomeadamente proteases, que degradam um espectro de proteínas do hospedeiro, tais como elastina, fibrina e citoquinas (Jurado-Martín et al., 2021). Esses fatores facilitam a adesão e colonização da bactéria no hospedeiro, interrompem a integridade dos tecidos e competem pela obtenção de nutrientes essenciais, desempenhando um papel essencial na sua capacidade patogénica (Liao et al., 2022).

Os exopolissacarídeos, como Psl, Pel, e alginato, são componentes essenciais da matriz do biofilme de *P. aeruginosa*. Psl é um pentassacarídeo neutro composto por D-manose, D-glucose, e L-ramnose (Melaugh et al., 2023; L. Yang et al., 2011). Este exopolissacarídeo é fundamental na adesão de células sésseis a superfícies durante as fases iniciais da formação do biofilme, tanto em estirpes mucoides quanto não mucoides de *P. aeruginosa* (Jones et al., 2017; Thi et al., 2020). Num estudo recente foram analisadas estirpes de *P. aeruginosa* modificadas para não produzirem nem Psl nem Pel, e verificou-se que não houve formação de agregados celulares (Melaugh et al., 2023). Isso demonstra o papel crucial de Psl na estruturação e estabelecimento de biofilmes.

Pel é um polissacarídeo catiónico composto por N-acetil-d-glucosamina e N-acetil-d-galactosamina. Este é também um componente essencial na matriz do biofilme de *P. aeruginosa* (Jennings et al., 2015; Thi et al., 2020)

O alginato é o componente predominante nas estirpes mucoides de *P. aeruginosa*, consistindo em ácidos D-manurónico e L-gulurónico, unidos por ligações  $\beta$ 1-4. Este polissacarídeo desempenha um papel vital na formação e estruturação dos biofilmes, contribuindo para a sua maturação e estabilidade. Além disso, o alginato está diretamente relacionado com a capacidade da bactéria de persistir no hospedeiro, fornecendo proteção contra a fagocitose pelas células imunitárias, como macrófagos e neutrófilos (Jurado-Martín et al., 2021).

*P. aeruginosa* secreta várias proteases que desempenham um papel fundamental na sua interação patogénica com o hospedeiro. A elastase B, codificada pelo gene *lasB*, é uma metaloprotease dependente de zinco, sendo essencial para a colonização pulmonar, particularmente em pacientes com fibrose quística (Mohan et al., 2024). Esta enzima degrada a elastina, um biopolímero que confere elasticidade aos tecidos conectivos dos pulmões, pele, vasos sanguíneos e bexiga, regiões frequentemente afetadas por esta bactéria (Everett et al., 2021; Fortuna et al., 2024). Além da elastina, LasB degrada outros biopolímeros, como colagénio, fibrinogénio, imunoglobulinas e citocinas, contribuindo para o dano tecidual. A ativação completa de LasB requer iões de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) e zinco ( $\text{Zn}^{2+}$ ), que estabilizam a enzima na sua forma ativa. O zinco, em particular, é essencial para a sua função catalítica, sendo a capacidade de degradação de múltiplas proteínas o que torna LasB um potente fator de virulência (Fortuna et al., 2024; Mohan et al., 2024).

LasA é uma protease dependente de zinco também secretada por *P. aeruginosa*, que desempenha um papel essencial na virulência e na interação patogénica com o hospedeiro. LasA, é codificada pelo gene *lasA* e é secretada através do sistema de secreção tipo II (T2SS) (Mohan et al., 2024). Esta protease também denominada de estafilolisina, atua sobre o *S. aureus* ao romper as pontes de pentaglicina do peptidoglicano da sua parede celular, levando à lise desse coco. Além disso, LasA amplifica a atividade elastolítica da elastase LasB, contribuindo para a destruição dos tecidos do hospedeiro e aumentando a virulência da bactéria (Mohan et al., 2024).

AprA, também conhecida como aeruginolisina, é uma metaloprotease codificada pelo gene *aprA*. Esta enzima está associada à evasão da fagocitose e à necrose do tecido

durante infecções causadas por *P. aeruginosa* (Galdino et al., 2017). AprA é expressa em isolados clínicos obtidos em vários locais anatómicos, como olhos, trato gastrointestinal e pulmões, particularmente em exacerbações em pacientes com fibrose quística (Galdino et al., 2017) Além de degradar proteínas do hospedeiro, nomeadamente fibronectina e laminina, bloqueia a ativação do complemento (C1q, C2 e C3), o que enfraquece a resposta imunitária, permitindo que a bactéria evite a destruição por neutrófilos (Laarman et al., 2012).

## 2.2. *Staphylococcus aureus*

*S. aureus* é uma bactéria Gram-positiva associada a várias doenças adquiridas na comunidade e em ambiente hospitalar. É um dos patógenos oportunista mais comuns em humanos, causando infecções que levam a altos índices de morbidade e mortalidade (Abbasian et al., 2018). *S. aureus* tem vários fatores de virulência, incluindo proteínas de superfície envolvidas em adesão bacteriana, enzimas extracelulares e toxinas que promovem necrose do tecido e fatores além de fatores que interferem com o sistema imunológico. *S. aureus* pode sintetizar várias enzimas para aumentar sua patogenicidade e disseminação no hospedeiro, como coagulase, hialuronidase, desoxirribonuclease e lípase (Tam et al., 2019).

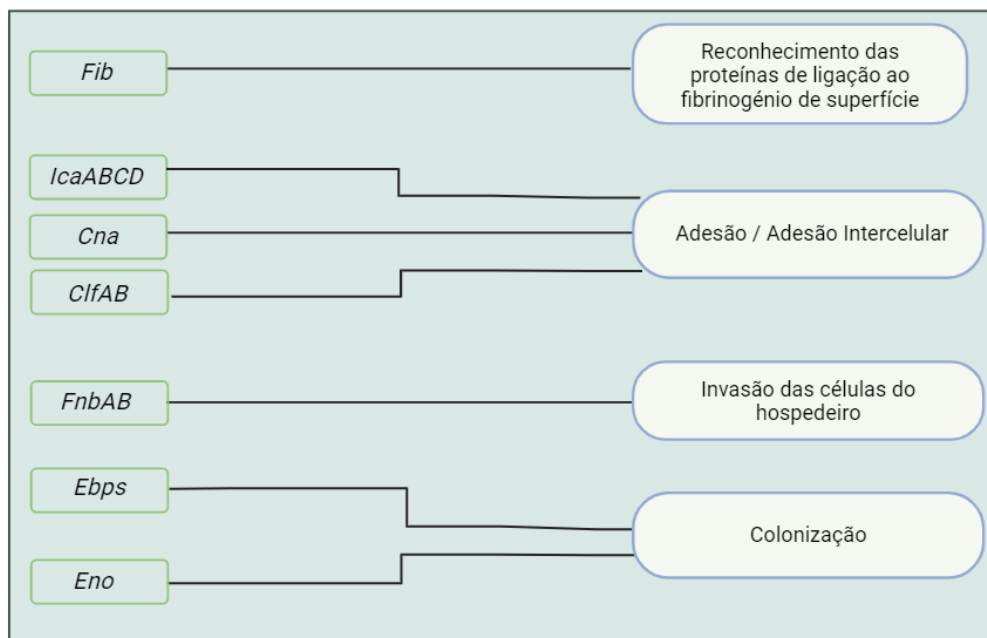
A formação de biofilme por *S. aureus*, a produção de toxinas e as estratégias de evasão imunológica limitam as respostas imunológicas do hospedeiro o que contribui para a gravidade destas infecções (Muthukrishnan et al., 2019; Otto et al., 2014)

Nos biofilmes de *S. aureus*, o principal componente da matriz EPS é a adesina polissacarídica intercelular (PIA), também chamado PNAG devido à sua composição química, polímero  $\beta$  (1-6) -N-acetilglucosamina (Idrees et al., 2021). Este polissacarídeo catiónico desempenha um papel vital na ligação entre células bacterianas, promovendo a formação de biofilmes, a colonização e resistência a antimicrobianos, além de facilitar a evasão do sistema imunitário e resistência à fagocitose (Nguyen et al., 2020). Proteínas como Aap, Spa, FnBP e SasG também ajudam a reforçar a estrutura do biofilme estafilocócico (Idrees et al., 2021; Pietrocola et al., 2019).

As proteínas ancoradas à parede celular (CWA), ligadas covalentemente ao peptidoglicano por transpeptidases, são cruciais para a adesão bacteriana (Foster et al.,

2014; Lacey et al., 2017). Existem cerca de 24 tipos de CWA de *S. aureus*, que são divididas em quatro categorias propostas por Foster e colaboradores (Foster et al., 2014): MSCRAMM (componentes de superfície microbiana que reconhecem moléculas da matriz adesiva), NEAT (transportadores de ferro), proteínas de três hélices e proteínas de repetição G5-E. As CWA facilitam a adesão ao substrato e a formação do biofilme. Além disso, o DNA extracelular (eDNA), presente na matriz EPS, desempenha um papel importante na estruturação, transferência de genes e resistência antimicrobiana, sendo também importante para a adesão irreversível (Das et al., 2011; Miao et al., 2019)

A formação do biofilme de *S. aureus* é controlada por um conjunto de genes específicos, com 12 deles desempenhando papéis principais em diferentes etapas do processo. Estes genes incluem aqueles que codificam proteínas que se ligam ao fibrinogênio (*fib*), à fibronectina (*fnbA*, *fnbB*), e proteínas de adesão intercelular (*icaA*, *icaB*, *icaC*, *icaD*) (Figura 6). Além disso, envolvem genes que codificam fatores de aglomeração (*clfA*, *clfB*), e proteínas de ligação à elastina (*ebps*), laminina (*eno*) e colagênio (*cna*). Estes genes facilitam a adesão bacteriana às superfícies, promovendo a penetração e colonização que resultam na formação de biofilmes (Nourbakhsh et al. 2016).



**Figura 6-** Genes e as suas funções na formação de biofilme por *S. aureus*. Adaptado de (Idrees et al., 2021).

### 3. Infecções associadas biofilmes

As infecções bacterianas em humanos associadas a biofilmes são mais difíceis de tratar devido às características dos biofilmes, onde as bactérias estão mais protegidas do sistema imunitário do hospedeiro e dos agentes antimicrobianos.

Estes biofilmes podem ser associados a dispositivos médicos ou não, formando-se, neste último caso, no tecido do hospedeiro, mucosas ou nas superfícies do trato respiratório e digestivo (Tabela 1) (Di Domenico et al., 2022; Mirzaei, et al., 2020). Exemplos de infecções humanas associadas a biofilmes são infecções de feridas crónicas, infecções do trato urinário, osteomielite e infecções da cavidade oral como cárie dentária e periodontite, infecções relacionadas com dispositivos médicos como cateteres, lentes de contacto e próteses (Mirzaei et al., 2020). Os biofilmes bacterianos estão também frequentemente associados a infecções do trato respiratório inferior, especialmente em indivíduos com depuração mucociliar anormal e defesas comprometidas, como no caso de fibrose quística (Schulze et al., 2021).

**Tabela 1-** Infecções associadas a biofilmes e organismos responsáveis (Mirzaei, et al., 2020).

<b>Infeção</b>	<b>Organismo</b>
Infeção do trato urinário (ITU)	<i>Escherichia coli</i> uropatogénica (UPEC), <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterococcus faecalis</i>
Infeções pulmonares (fibrose quística)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Otite média	<i>Haemophilus influenzae</i> não tipável, <i>Streptococcus pneumoniae</i>
Endocardite	Estreptococos do grupo <i>Viridans</i> , <i>Staphylococcus</i> spp.
Amigdalite	Estreptococos do Grupo A
Periodontite	Bactérias anaeróbias Gram-negativas
Fascite necrosante	Estreptococos do Grupo A

### 3.1. Infeções do trato urinário

O trato urinário é composto por uma diversa flora bacteriana comensal, que através do seu metabolismo torna o meio bastante ácido, que por norma impede a progressão para infecção (Schulze et al., 2021). No entanto, as infeções do trato urogenital (ITU) estão entre as infeções mais frequentes na população (Stefaniuk et al., 2016).

Apesar da maioria das ITU terem como agentes etiológicos bactérias Gram-negativas (*E. coli*, *P. mirabilis*, *K. pneumoniae*), algumas bactérias Gram-positivas, como por exemplo *S. epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *S. aureus* e *E. faecalis* têm surgido como a causa cada vez mais frequente em populações especiais como idosos e grávidas (Kline & Lewis, 2016).

A bactéria responsável pela maioria dos casos de ITU complicada e não complicada é *E. coli* uropatogénica (UPEC) (Flores-Mireles et al., 2015). As bactérias uropatogénicas são caracterizadas por vários fatores de virulência necessários para a adesão inicial e colonização da mucosa e invasão do tecido, ultrapassando as barreiras de defesa do sistema imunitário e causando infeções crónicas e persistentes. A adesão é facilitada por adesinas fimbriais, sobretudo fimbria tipo 1 (Vega-Hernández et al., 2021). Estas adesinas não só mediam a adesão como são importantes indutores de citoquinas, induzindo a inflamação do tecido e iniciando a formação do biofilme (Vega-Hernández et al., 2021).

As infeções do trato urinário (ITU) podem ser classificadas em três categorias principais: ITU não complicadas, ITU complicadas e infeções urinárias associadas a cateteres (ITU-AC). As ITU não complicadas são comuns na prática clínica, geralmente afetando indivíduos saudáveis sem comorbilidades, e afetam predominantemente o trato urinário inferior. Por outro lado, as ITU complicadas, que estão frequentemente associadas a fatores de risco como doenças crónicas ou condições subjacentes, são uma causa significativa de septicemia no ambiente hospitalar. Estas infeções apresentam maior resistência aos antibióticos, muitas vezes exigindo tratamentos prolongados (Sabih et al., 2023). As ITU-AC, de acordo com o *Center for Disease Control* (CDC), ocorrem quando bactérias invadem o trato urinário através de um cateter urinário, sendo estas infeções particularmente prevalentes em doentes hospitalizados (Fokkens et al., 2020).

Os biofilmes desempenham um papel crucial na patogênese das infecções do trato urinário (ITUs), sendo especialmente relevantes nas infecções do trato urinário associadas a cateteres (ITU-AC). A formação de biofilmes é um dos principais mecanismos que contribui para as elevadas taxas de recorrência e resistência aos antibióticos, frequentemente observadas em ITUs (Lila et al., 2023).

Quando as bactérias conseguem ultrapassar a barreira fisiológica, aderem ao epitélio uretral, por um processo mediado por estruturas especializadas como fímbrias e adesinas bacterianas, essenciais para a colonização inicial (Delcaru et al., 2016). Esses fatores facilitam a propagação dos agentes patogênicos até à bexiga, onde a colonização é sustentada pela motilidade e produção de toxinas, como proteases, hemolisinas e urease, que contribuem para a necrose tecidual. A formação de biofilmes ajuda as bactérias a resistir à resposta imunológica, podendo a infecção progredir para os rins e, em casos graves, levar à bacteriemia (Flores-Mireles et al., 2015; McLellan et al., 2016).

Os sintomas associados às ITUs incluem bacteriúria, febre, disúria, prurido, aumento da frequência e urgência urinária, dor suprapúbica e, por vezes, a formação de lesões como bolhas e úlceras na região urogenital (Chu & Lowder, 2018).

### 3.2. Feridas crônicas

É comum a formação de biofilmes estar associada a corpos estranhos como cateteres, pacemakers e próteses ortopédicas, no entanto, também se podem desenvolver em tecidos, atuando como reservatórios de bactérias que se podem disseminar a outras partes do corpo (Srivastava et al., 2016).

Uma ferida crônica é definida por uma interrupção no processo de cicatrização. As feridas crônicas, nomeadamente úlceras diabéticas e úlceras de pressão são mais frequentes na população idosa e representam um desafio relativamente ao tratamento (Wu et al., 2019). É a formação de biofilmes que explica porque certas feridas e úlceras, podem ser persistentes e crônicas (Di Domenico et al., 2022). Estas infecções associadas à formação de biofilme tendem a ser crônicas porque apresentam-se com uma tolerância maior a antibióticos, uma capacidade acentuada de escapar as defesas do sistema imunitário e uma resposta inflamatória que intensifica o dano nos tecidos (Delcaru et al., 2016).

A resposta imunológica torna-se insuficiente para combater a infecção associada à presença do biofilme, que pode ser formado por uma ou por múltiplas espécies de bactérias (areóbias e anaeróbias) e até de outros microrganismos como leveduras (Serra et al., 2015). Entre os patógenos mais frequentemente associados a uma cicatrização prolongada estão *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Candida albicans* e *Streptococcus*  $\beta$ -hemolíticos (Diban et al., 2023).

As interações entre diferentes espécies bacterianas, juntamente com as condições do microambiente, desempenham um papel crucial no comportamento das bactérias e na sua virulência, influenciando o resultado das infecções em feridas (Pouget et al., 2020). *S. aureus* e *P. aeruginosa* são os principais microrganismos isolados em feridas crônicas, e a sua interação têm sido amplamente estudada (Serra et al., 2015). Por exemplo, a coinfeção dessas duas bactérias está associada a uma resposta inflamatória mais exacerbada, ao aumento da resistência antimicrobiana e à manutenção da cronicidade das feridas (Nguyen & Oglesby-Sherrouse, 2016). De modo geral, a distribuição desses microrganismos na ferida revela que *P. aeruginosa* tende a colonizar as camadas mais externas, devido às suas características aeróbias enquanto *S. aureus* se localiza predominantemente nas camadas mais internas (Kucera et al., 2014; Rubio-Canalejas et al., 2022).

A formação de biofilmes em feridas crônicas provoca diversos sinais característicos, como um leito da ferida pálido e edemaciado, tecido de granulação frágil, grande quantidade de exsudado, tecido necrótico em decomposição, dor e um odor pungente. Embora estas manifestações clínicas possam ser indicativas da presença de biofilmes, não são suficientemente precisas para garantir um diagnóstico definitivo (Wei et al., 2019).

### 3.3. Infeções relacionadas com o trato respiratório

Respirar expõe as vias aéreas a microrganismos incluindo patógenos ambientais bem como vários oportunistas da microbiota comensal oral e nasofaríngea (Hall-Stoodley & McCoy, 2022).

A rinosinusite é uma inflamação que afeta os seios nasais e perinasais, manifestando-se por bloqueio, obstrução, congestão nasal, obstrução e rinorreia nasal

anterior/posterior (Fokkens et al., 2020). Outros sintomas comuns incluem perda de olfato, dor na face e sensação de pressão. A rinossinusite é classificada como aguda quando tem duração inferior a 12 semanas, e como crônica quando ultrapassa esse período (Sen Tan et al., 2017). A resposta imunitária a infecções virais envolve mecanismos específicos e inespecíficos que, embora eliminem o vírus, também levam à destruição de células epiteliais e imunitárias. Esse processo cria condições favoráveis para a instalação de infecções secundárias, como infecções bacterianas associadas à formação de biofilme (Sen Tan et al., 2017).

A presença de biofilmes na rinossinusite crônica envolve diversos microrganismos, como *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Haemophilus influenzae* e *Moraxella catarrhalis* (Boase et al., 2013).

A fibrose quística é uma doença limitante causada por mutações no gene que codifica o regulador da condutância transmembranar da fibrose quística (CFTR), e é caracterizada pela inflamação e infecção bacteriana crônica (Cantin et al., 2015; Martin et al., 2021). A CFTR é uma proteína que forma um canal de cloreto na membrana celular, regulado pela fosforilação mediada por cAMP. Quando ATP está presente, a fosforilação da CFTR permite a abertura do canal, permitindo que os íons de cloreto saiam da célula. No entanto, mutações no gene *CFTR* podem resultar em proteínas defeituosas, que impedem o transporte de cloreto, levando à acumulação de íons e moléculas de água nas células epiteliais, resultando na desidratação do muco e provocando secreções espessas nos pulmões e outros órgãos (Chen et al., 2021).

### 3.4. Infecções associadas a dispositivos médicos

O uso de dispositivos médicos, como cateteres, válvulas protéticas, stents e próteses articulares, tem melhorado significativamente a qualidade de vida dos pacientes, contudo, essas superfícies são suscetíveis à formação de biofilmes (Di Domenico et al., 2022; Zhao et al., 2023).

Os implantes ortopédicos são amplamente utilizados na fixação de fraturas, correção de deformidades ósseas e substituição de articulações, proporcionando o suporte mecânico necessário para manter o alinhamento e função adequada do osso (Filipović et al., 2020). Quando bactérias aderem a biomateriais como aço, titânio, cerâmica e

polímeros, o processo de adesão é influenciado por diversos fatores externos, como a hidrodinâmica, a composição do meio, a temperatura, o pH e a pressão sobre a superfície do biomaterial (Khatoon et al., 2018). Esses fatores tornam o tratamento das infecções mais desafiador, uma vez que os biofilmes aumentam a resistência bacteriana e dificultam a ação dos agentes antimicrobianos (Bohinc et al., 2014).

As infecções em próteses articulares são tipicamente classificadas de acordo com o tempo de início. Se a infecção ocorre nos primeiros três meses após a cirurgia, é considerada uma infecção primária e geralmente resulta da contaminação durante o procedimento cirúrgico, sendo frequentemente causada por organismos mais virulentos. Quando a infecção surge entre o terceiro e o décimo segundo mês, embora ainda relacionada com a contaminação intraoperatória, tende a ser provocada por organismos de menor virulência (Tande et al. 2014).

Os microrganismos que infetam implantes variam conforme o local anatômico em que estão inseridos (Percival et al., 2015). As espécies de *Staphylococcus*, incluindo *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) e estafilococos coagulase-negativa, e *E. faecalis*, são os principais responsáveis por estas infecções (Arciola et al., 2018). Embora bactérias Gram-negativas, como *P. aeruginosa* e *E. coli*, também possam causar infecções, a sua prevalência é significativamente menor em comparação com as estirpes de *S. aureus* (Montanaro et al., 2011).

A infecção do trato urinário associada a cateteres (ITU-AC) é uma das infecções mais comumente adquiridas nos locais de prestação de cuidados de saúde; 70-80% são atribuídos à utilização de um cateter uretral (Nicolle, 2014). Os cateteres urinários são usualmente feitos de silicone ou látex e bastante utilizados em utentes hospitalizados (Lila et al., 2023). Este tipo de infecções são das mais comuns entre as infecções nosocomiais sendo responsáveis por cerca de 40% de todas as infecções adquiridas em ambiente hospitalar (Oumer et al., 2021).

O cateter é um corpo estranho, por isso, é induzida uma resposta inflamatória, que envolve edema e deposição de fibrinogénio na superfície do cateter (Oumer et al., 2021). Apesar de este ser um mecanismo de defesa para lubrificar o local, acaba por ser também um ambiente ideal, rico em nutrientes, para a adesão de agentes patogénicos (Venkataraman & Yadav, 2023).

Com o surgimento de sistemas como pacemakers, cardioversores-desfibriladores implantáveis e a terapia de ressincronização cardíaca, o uso de dispositivos eletrônicos cardiovasculares implantáveis tornou-se essencial no tratamento de pacientes com doenças cardíacas (Al-Khatib et al., 2018; Kotalczyk et al., 2020). Atualmente, a utilização de válvulas protéticas e dispositivos intracardíacos está em expansão, especialmente em países desenvolvidos, onde o avanço médico e tecnológico é mais acentuado. No entanto, esses dispositivos podem servir como focos de infecção, contribuindo para o aumento da incidência de endocardite de válvula protética (EVP) nessas regiões (Cahill et al., 2016).

A endocardite da válvula cardíaca protética (EVP) é uma complicação grave da endocardite infecciosa (EI), com uma taxa de mortalidade elevada, afetando entre 1-6% dos pacientes com próteses valvulares cardíacas, sejam elas mecânicas ou nativas (Habib et al., 2015). Na EVP precoce (menos de 12 meses após a implantação), os microrganismos mais frequentemente identificados são *S. aureus* (36%) e estafilococos coagulase-negativo (Tan et al., 2015). Já na EVP tardia (mais de 12 meses após a implantação), os patógenos associados são semelhantes aos encontrados na endocardite de válvula nativa. Neste caso, a incidência de *S. aureus* e estafilococos coagulase-negativos diminui para 18-20%, enquanto aumenta a prevalência de enterococos e *Streptococcus* do grupo Viridans, ambos com taxas de 10-13% (Ivanovic et al., 2019; Tan et al., 2015).

A inserção de dispositivos como cateteres venosos centrais (CVC) está fortemente associada à alta prevalência de infecções nosocomiais, uma vez que esses dispositivos são frequentemente contaminados por microrganismos, particularmente espécies formadoras de biofilmes. Esses cateteres são essenciais em cuidados intensivos para administração de fluidos e monitorização de parâmetros hemodinâmicos, mas, quando contaminados, podem causar infecções graves, resultando em maior mortalidade e prolongamento da hospitalização em unidades de cuidados intensivos (Brunelli et al., 2018).

As infecções relacionadas com a cateterização são frequentemente provocadas por microrganismos resistentes de *Enterococcus* spp., *Staphylococcus* spp., e fungos como *Candida* spp., o que torna seu tratamento mais difícil e representa um desafio significativo no ambiente hospitalar (Liao et al., 2022). A extensão do biofilme depende da localização e é proporcional à duração do cateterismo; a formação do mesmo concentra-se na

superfície externa durante os primeiros dez dias, e alcança o lúmen do cateter após trinta dias (Jamal et al., 2018).

#### **4. Desafios no diagnóstico de infecções por biofilmes**

Um dos principais desafios no diagnóstico de infecções associadas a biofilmes reside no facto de que os métodos de diagnóstico tradicionalmente usados, como os testes de suscetibilidade antimicrobiana, continuam a ser realizados em bactérias no estado planctónico. Estas bactérias estão em suspensão e comportam-se de maneira muito diferente das bactérias que fazem parte de um biofilme, o que gera resultados que não correspondem à realidade clínica (Ferrer et al., 2017).

Embora a compreensão sobre a fisiologia e patologia dos biofilmes tenha avançado, as ferramentas de diagnóstico e tratamento disponíveis ainda não acompanham essa evolução. Uma das razões para esta discrepância é a falta de testes microbiológicos padronizados capazes de identificar eficazmente bactérias produtoras de biofilmes e de avaliar a suscetibilidade a antibióticos em comunidades bacterianas complexas (Di Domenico et al., 2024).

A diversidade metabólica e os ambientes protegidos dentro dos biofilmes tornam os métodos tradicionais de suscetibilidade menos eficazes, resultando muitas vezes em decisões clínicas inadequadas (Di Domenico et al., 2022). Além disso, as diretrizes clínicas atuais são muitas vezes imprecisas para lidar com infecções por biofilmes, o que levantou a questão ao Grupo de Estudo para os Biofilmes da ESCMID relativamente à necessidade de atualizar as diretrizes atuais (Høiby et al., 2023).

##### **4.1. Métodos de diagnóstico recomendados**

Atualmente, a deteção de infecções associadas a biofilmes enfrenta desafios consideráveis. De acordo com as diretrizes publicadas em 2014 pela ESCMID, são recomendados vários métodos laboratoriais para facilitar o diagnóstico e acelerar o tratamento. Entre os métodos convencionais sugeridos estão a microscopia eletrónica e a reação em cadeia da polimerase (PCR) (Høiby et al., 2015).

#### 4.1.1. Técnicas de microscopia

Os métodos baseados em técnicas de visualização microscópica são amplamente reconhecidos como uma das abordagens mais eficazes para a detecção de biofilmes, devido à sua capacidade de fornecer imagens detalhadas da estrutura tridimensional dos agregados microbianos (Costa-Orlandi et al., 2017). Entre as técnicas mais utilizadas destacam-se a microscopia eletrônica e a microscopia confocal, e que permitem a análise da arquitetura dos biofilmes em amostras biológicas e dispositivos médicos (Schlafer & Meyer, 2017).

A microscopia eletrônica de varrimento (SEM) também é amplamente utilizada para obter imagens de alta resolução das superfícies dos biofilmes, que ajudam a destacar os detalhes da estrutura do biofilme e da superfície das células microbianas que o compõem (Silva et al., 2021). Esta técnica baseia-se na dispersão e absorção de elétrons, o que proporciona uma profundidade significativa, dando uma aparência tridimensional da superfície do biofilme (Achinas et al., 2020). Este método é valioso para estudar as superfícies dos biofilmes, no entanto, uma desvantagem principal é a necessidade de tornar as amostras condutoras, o que requer a aplicação de uma fina camada de ouro ou liga metálica (Y. Huang et al., 2020; Mohammed et al., 2017). Este processo inclui várias etapas de preparação, como secagem, fixação, desidratação e revestimento, que são demoradas e podem comprometer a estrutura original do biofilme (Costa-Orlandi et al., 2017).

Para superar esta limitação, surgiu a microscopia eletrônica de varrimento ambiental (ESEM), que possibilita a análise de biofilmes em condições hidratadas sem um pré-tratamento exaustivo. Esta técnica mantém a estrutura natural das amostras, reduzindo a necessidade de desidratação, ainda que a precisão da imagem seja ligeiramente inferior (Huang et al., 2020).

Para uma análise mais aprofundada da estrutura interna, a microscopia eletrônica de transmissão (TEM) oferece uma visão detalhada das células do biofilme, incluindo da sua membrana celular. Esta técnica implica o uso de resinas para preservar a matriz extracelular garante uma observação mais estável, permitindo uma avaliação precisa das características internas do biofilme (Mohammed et al., 2017). A técnica baseia-se na medição das interações elásticas e inelásticas de um feixe de elétrons que atravessa a

amostra, além disso, a amostra é analisada num ambiente de vácuo para reduzir as interações indesejadas entre os elétrons e os gases, sendo essencial a preparação prévia (Kim et al., 2018).

A microscopia confocal de varrimento a laser (CLSM) é uma técnica fundamental para obter imagens tridimensionais detalhadas dos biofilmes. Uma das limitações da resolução espacial deste tipo de microscopia ótica é superada através do acoplamento à detecção de fluorescência. Com a utilização de corantes específicos, este método facilita a visualização de diversos componentes do biofilme, incluindo macromoléculas como polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos e lípidos (Costa-Orlandi et al., 2017; Huang et al., 2020; Sugimoto et al., 2016).

#### 4.1.2. Biomarcadores

O diagnóstico de infeções associadas a biofilmes, especialmente em dispositivos médicos implantados, é um desafio devido à dificuldade de amostragem direta e à detecção precisa de biofilmes (Xu et al., 2020). Biomarcadores são características que indicam processos biológicos normais, patológicos ou respostas a estímulos externos. A sua definição é ampla, abrangendo intervenções terapêuticas, e pode incluir fatores moleculares, histológicos, radiográficos ou fisiológicos (Califf, 2018; FDA-NIH Biomarker Working Group, 2016).

Um exemplo prático da aplicação de biomarcadores no diagnóstico de biofilmes pode ser encontrado num estudo realizado por Morelli e colaboradores que analisou a presença de biomarcadores salivares em doenças periodontais (Morelli et al., 2014). Os resultados demonstraram que níveis elevados do marcador Interleucina-6 (IL-6) e o antagonista do recetor da Interleucina-1 (IL-1ra), estavam correlacionados com uma maior profundidade de sondagem e inflamação periodontal, sugerindo a sua utilidade na deteção precoce de infeções associadas a biofilmes periodontopatogénicos.

#### 4.1.3. Métodos baseados em culturas

Os métodos de diagnóstico baseados em culturas continuam a ser uma abordagem usada para identificar infecções associadas a biofilmes. Um método padrão amplamente reconhecido ainda não foi estabelecido devido a várias limitações, incluindo procedimentos complexos e a necessidade de equipamentos específicos (Drago et al., 2013).

Segundo as diretrizes publicadas pela ESCMID, o tipo de amostras colhidas é também um passo importante para a detecção de biofilmes. Por exemplo para identificar biofilmes em feridas crônicas, as biópsias de tecido são as amostras mais fiáveis, pois amostras recolhidas por zaragoas podem ser contaminadas pela flora da pele e não representam adequadamente os biofilmes profundos (Høiby et al., 2015).

##### 4.1.3.1. Método de formação de biofilme em placa de 96-poços e quantificação do biofilme formado pelo método do cristal violeta

O método de formação de biofilme em placa de 96-poços é um método amplamente utilizado devido à sua simplicidade e reprodutibilidade. Os passos principais deste método (Shukla & Rao, 2017) são brevemente descritos de seguida. Um inóculo bacteriano padronizado é preparado em meio de cultura apropriado, e de seguida, alíquotas desse inóculo são transferidas para os poços da placa de 96-poços de fundo plano, seguindo-se incubação em condições adequadas para o crescimento bacteriano e formação do biofilme. Após a incubação, a fase planctónica é removida, o biofilme formado e aderido é lavado com solução salina e de seguida corado com cristal violeta (0,1 a 0,5%). Por fim, adiciona-se etanol ou uma solução de ácido acético (20-30%) para solubilizar o cristal violeta aderido e mede-se a absorbância a 570-595 nm em um leitor de microplacas. A intensidade da absorbância é proporcional à quantidade de biofilme formado.

Neste método, as células bacterianas são cultivadas em poços e lavadas para remover células livres antes da quantificação da biomassa aderida. Parte dessa biomassa pode, contudo, resultar de células sedimentadas, não refletindo a formação de biofilme. O dispositivo de Calgary supera essa limitação ao usar uma tampa com pinos que promovem

a adesão sésil, permitindo uma quantificação mais precisa da biomassa, apesar de algumas limitações na recuperação celular por sonicação, usada para destacar e desagregar as células aderidas (Azeredo et al., 2017).

#### 4.1.3.2. Método do agar vermelho congo (CRA)

O CRA deteta biofilmes através de uma reação colorimétrica que ocorre devido à interação do corante vermelho congo com componentes produzidos por bactérias formadoras de biofilmes, como a matriz extracelular rica em polissacarídeos e proteínas. Quando uma bactéria é capaz de formar biofilme, as suas colónias assumem uma coloração preta com uma textura seca e cristalina no CRA, indicando a presença do biofilme. Em contraste, colónias de bactérias que não produzem biofilme permanecem com uma coloração avermelhada (Vaibhav Sande & Santosh Debnath, 2020).

Esta técnica é considerada qualitativa, sendo especialmente útil para uma deteção rápida apesar de não quantificar o biofilme de forma precisa.

#### 4.1.4. Métodos moleculares

Os métodos moleculares baseados em ácidos nucleicos começam com a extração de DNA ou RNA da amostra (Oliva et al., 2021). Estes métodos, nomeadamente o PCR, são amplamente aplicados para caracterizar sequências genéticas (Chambliss & Marzinke, 2020). No entanto, as tecnologias baseadas em DNA enfrentam limitações, incluindo a incapacidade de determinar a viabilidade das células e de diferenciar entre microrganismos no estado biofilme ou planctónico, por exemplo (Xu et al., 2020).

##### 4.1.4.1. Reação em cadeia da polimerase

A técnica de PCR foca-se na amplificação de segmentos específicos de DNA. A técnica de PCR tem sido aplicada diretamente a amostras clínicas na identificação de patógenos relacionados com biofilmes. Um exemplo foi a investigação de Shahmoradi e

colaboradores, que usou PCR para detetar isolados de *S. aureus* em várias amostras clínicas, incluindo urina, sangue e outros fluidos corporais (Shahmoradi et al., 2019).

Quando aplicada à análise de biofilmes, esta técnica permite também a deteção precisa e rápida de genes que estão relacionados com a formação de biofilmes, com a resistência bacteriana e com a virulência, o que aumenta a sensibilidade e especificidade do diagnóstico (Rajapaksha et al., 2019).

Diversos estudos têm usado a técnica de PCR para avaliar a capacidade formadora de biofilme *in vitro* de diversos isolados clínicos (Hemmati et al., 2024; Manandhar et al., 2018). Por exemplo, Klančnik e colaboradores aplicaram uma metodologia baseada em PCR para quantificar a adesão de células de *Listeria monocytogenes* aos poços de placas de poliestireno de 96-poços. Neste estudo, foram utilizadas técnicas de PCR digital e PCR em tempo real para avaliar a adesão e a formação de biofilmes de diferentes estirpes de *L. monocytogenes* ao longo do tempo, destacando a precisão destas técnicas na quantificação de células aderentes e na identificação de características genéticas associadas à formação de biofilmes (Klančnik et al., 2015).

A técnica de PCR em tempo real (qPCR) para além da deteção, permite também a quantificação rápida de microrganismos específicos dentro de comunidades complexas (Magalhães et al., 2019).

Para superar algumas das limitações inerentes às técnicas de PCR, outras variantes da técnica, como o PMA-qPCR, têm sido cada vez mais utilizadas. O propídio de monoazida (PMA) é uma molécula que se intercala na cadeia dupla do DNA, e permite diferenciar as bactérias vivas das mortas ou com membranas danificadas, uma vez que forma ligações covalentes estáveis com o DNA das células danificadas após fotoativação. Essa ligação, PMA-DNA inibe a amplificação por PCR do DNA de bactérias mortas, permitindo assim apenas a amplificação e quantificação de células viáveis. Contudo, o PMA-qPCR não está isento de desafios, incluindo alterações na permeabilidade da membrana celular, que podem afetar a absorção do corante, resultando em possíveis falsos positivos (Taylor et al., 2014).

## 4.2. Métodos em desenvolvimento

A detecção eficaz e em tempo real de biofilmes é essencial para melhorar o diagnóstico e também para fazer o seguimento da eficácia terapêutica, uma vez que intervenções precoces estão associadas a prognósticos mais favoráveis. Técnicas tradicionais, requerem procedimentos invasivos para coleta de amostras e muitas vezes falham devido a erros de amostragem, especialmente em infecções associadas a implantes ortopédicos (Jain, 2017).

Com o objetivo de superar essas limitações, torna-se necessário o desenvolvimento de metodologias avançadas, incluindo técnicas de imagem de alta precisão, diagnósticos moleculares e detecção de biomarcadores específicos. Uma das inovações, ainda a desenvolver, é a criação de sondas de imagem médica para detectar biofilmes bacterianos, permitindo uma quantificação não invasiva e em tempo real da presença de biofilmes. Este avanço poderia transformar radicalmente a gestão clínica das infecções associadas a biofilmes, oferecendo novas possibilidades de intervenção precoce e eficaz (Di Domenico et al., 2024).

### 4.2.1. Espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE)

A EIE é uma técnica usada para estudar as propriedades de materiais e os processos que ocorrem numa célula eletroquímica. Nesta técnica, interações como transferência de massa e carga são examinadas. Cada um desses processos pode ser representado por um circuito elétrico equivalente, composto de resistências e capacitores (Magar et al., 2021). Assim, a EIE permite investigar como essas propriedades influenciam a condutividade e resistência do sistema.

Biossensores eletroquímicos, usados para a detecção de biofilmes, classificam-se em dois tipos principais: não-faradaicos e faradaicos. A EIE não-faradaica é uma técnica não destrutiva que mede a impedância em diferentes frequências, possibilitando o acompanhamento gradual das mudanças no biofilme, embora seja mais lenta (Ameer et al., 2023). Em contraste, os métodos faradaicos centram-se em reações eletroquímicas específicas, permitindo uma análise rápida e detalhada dos componentes do biofilme, mas de forma destrutiva e menos sensível a pequenas variações. Estes são, portanto, indicados

quando é necessária uma caracterização mais específica dos elementos do biofilme, sem necessidade da preservação da sua estrutura (Ameer et al., 2023).

#### 4.2.2. Superfícies antiaderentes

As superfícies antiaderentes para dispositivos médicos utilizam uma combinação de mecanismos de repulsão para reduzir a formação de biofilmes ao evitar a adesão bacteriana (Unepetty et al., 2022). Os polímeros aplicados ao revestimento criam uma barreira física, impedindo o contato direto entre as células bacterianas e a superfície (Gon et al., 2012). Além disso, o mecanismo de repulsão eletrostática usa cargas no revestimento para repelir microrganismos carregados, dificultando ainda mais a adesão (Huang et al., 2014). Esses mecanismos são incorporados em revestimentos antiaderentes como hidrogéis e polímeros tornando os dispositivos mais resistentes à colonização bacteriana (Unepetty et al., 2022).

### 5. Abordagens terapêuticas e obstáculos no combate aos biofilmes

Como já mencionado, anteriormente, os biofilmes representam uma barreira significativa para o tratamento antimicrobiano, pois a estrutura protetora da matriz do biofilme, rica em eDNA, proteínas e polissacarídeos, impede a penetração de antibióticos e potencia a resistência bacteriana, o que exige o desenvolvimento de abordagens inovadoras no controle de infecções associadas a biofilmes (Sharma et al., 2019).

#### 5.1. Tratamentos convencionais baseados em diretrizes clínicas

Atualmente no tratamento e prevenção de infecções pulmonares em doentes com fibrose quística, a abordagem terapêutica envolve o uso de antibióticos inalados e sistêmicos para combater as bactérias organizadas em biofilme frequentemente presentes nas vias respiratórias desses pacientes (Høiby et al., 2015).

A tobramicina é um aminoglicosídeo amplamente utilizado, tanto na forma de pó inalado quanto em solução, especialmente contra *P. aeruginosa*. Esta bactéria é

responsável por infecções persistentes em pacientes com fibrose quística, e a administração por via inalatória permite que o fármaco atue diretamente sobre o agente infeccioso presente nas vias respiratórias, embora com uma penetração limitada nos alvéolos (Konstan et al., 2011).

O aztreonam, um antibiótico da classe dos  $\beta$ -lactâmicos, também é utilizado por via inalatória. No entanto, o seu espectro de ação não abrange bactérias Gram-positivas nem anaeróbias. Além disso, as bactérias Gram-negativas organizadas em biofilme também apresentam tolerância ao antibiótico (Chmiel et al., 2014).

As bactérias multirresistentes, como *Pseudomonas aeruginosa*, requerem novos antibióticos com mecanismos inovadores para contornar os sistemas de resistência. Um dos antibióticos promissores é o doripenem, da classe dos carbapenemos, que atua sobre bactérias gram-positivas e gram-negativas, interferindo na síntese da parede celular (Jangra et al., 2022). Esta ação evita a degradação por  $\beta$ -lactamases, exceto em casos de metalo- $\beta$ -lactamases 34, foi aprovada pela FDA (Food and Drug Administration) para infecções do trato urinário e infecções intra-abdominais. (Queenan et al., 2010)

A plazomicina, é um aminoglicosídeo, possui modificações estruturais que lhe conferem resistência a enzimas modificadoras de aminoglicosídeos e à metilação do RNA 16S, o que permite a sua eficácia mesmo contra mecanismos típicos de resistência contra aminoglicosídeos convencionais (Cox et al., 2018).

Outro agente inovador é o POL7001, que interfere com a integridade da membrana externa ao inibir a proteína LptD, essencial no transporte de lipopolissacarídeos, o que facilita a entrada do antibiótico na célula (Cigana et al., 2016). A combinação ceftolozano-tazobactam, uma nova cefalosporina com um inibidor de  $\beta$ -lactamases, é eficaz em infecções complicadas intra-abdominais e do trato urinário, e possui alta afinidade por proteínas de ligação à penicilina (PBPs), superando barreiras de permeabilidade em bactérias multirresistentes (Zhanel et al., 2014)

Por fim, a combinação de ceftazidima-avibactam, um inibidor de  $\beta$ -lactamases e uma cefalosporina de 3ª geração respectivamente. Aprovada para tratar infecções urinárias complicadas, pneumonia adquirida em hospital e pneumonia associada a ventiladores, age contra beta-lactamases das classes A, C e algumas da classe D, embora seja ineficaz contra metalo- $\beta$ -lactamases (Bassetti et al., 2018; Shirley, 2018).

A formação de biofilmes nestes indivíduos representa um obstáculo significativo, reduzindo a eficácia dos antibióticos convencionais. Embora os antibióticos inalados atinjam concentrações elevadas nas vias aéreas superiores, são, contudo, geralmente insuficientes para erradicar eficazmente os biofilmes (Chmiel et al., 2014). Além disso, bactérias multirresistentes, como *Stenotrophomonas maltophilia* e do complexo *Burkholderia cepacia*, exigem combinações complexas de antibióticos e monitorização contínua para prevenir falhas terapêuticas (Tullis et al., 2014; Waters et al., 2013).

O tratamento de feridas crônicas, especialmente na presença de biofilmes, envolve uma combinação de estratégias não antimicrobianas e antimicrobianas. Inicialmente, métodos como desbridamento, compressão e terapia por pressão negativa são essenciais para preparar o leito da ferida, removendo tecido e reduzindo o biofilme (Høiby et al., 2015). Além disso, a combinação de diferentes antibióticos ou com desinfetantes locais ajuda a penetrar as barreiras do biofilme, otimizando o tratamento (Høiby et al., 2015). Esta abordagem integrada é fundamental para melhorar a resposta terapêutica e acelerar a cicatrização.

## 5.2. Resistência antimicrobiana

A resistência/tolerância dos biofilmes aos antibióticos resulta de vários mecanismos integrados, dificultando significativamente a eficácia dos tratamentos. Na superfície dos biofilmes, a matriz extracelular (EPS), composta de exopolissacarídeos, DNA e proteínas, atua como uma barreira que limita a penetração de antibióticos, retardando a difusão e aumentando a possibilidade de inativação dos medicamentos antes de atingirem as camadas internas (Prinzi & Rohde, 2023). Esta barreira depende da composição e espessura da matriz, varia entre espécies bacterianas e influencia a eficácia antimicrobiana de forma desigual (Grooters et al., 2024).

Além disso, as camadas mais profundas do biofilme apresentam um microambiente específico, caracterizado por baixos níveis de oxigênio, acumulação de produtos metabólicos e mudanças no pH. Essas condições interferem na ação de alguns antibióticos: a baixa oxigenação, por exemplo, reduz a eficácia de antibióticos como tobramicina e ciprofloxacina, enquanto alterações no pH podem impactar negativamente os aminoglicosídeos (Prinzi & Rohde, 2023).

### 5.3. Novas estratégias de erradicação de biofilmes

A inibição do QS é uma estratégia que visa interromper o sistema de comunicação entre bactérias, que regula processos cruciais como a formação de biofilmes e a produção de fatores de virulência.

As enzimas de *quorum quenching* (QQEs) e os inibidores de *quorum sensing* (QSIs) são dois tipos de agentes utilizados para interromper a comunicação entre células bacterianas. Os QSIs atuam em diferentes fases da sinalização bacteriana, seja inibindo a produção, secreção ou recepção dos sinais, ou competindo diretamente com as moléculas sinalizadoras, bloqueando a comunicação (Grandclément et al., 2016). Em contraste, as QQEs têm a capacidade de degradar ou alterar essas moléculas de sinalização dentro do ambiente microbiano (Rehman & Leiknes, 2018), entrando diretamente nas células e, assim, reduzindo a probabilidade de surgimento de resistência. Essa característica distingue as QQEs dos QSIs, uma vez que estes últimos interagem principalmente na superfície ou na envoltória das células bacterianas. Contudo, a menor estabilidade das QQEs apresenta um desafio para a sua aplicação mais ampla (Lu et al., 2022)

Os bacteriófagos, ou fagos, são vírus que infetam células bacterianas. A terapia fágica apresenta-se atualmente como uma alternativa promissora aos antibióticos no tratamento de infecções, sobretudo em infecções por bactérias multirresistentes e organizadas em biofilme. A capacidade dos fagos de erradicar biofilmes reside em vários mecanismos de ação, incluindo a produção de enzimas específicas que ajudam a degradar as estruturas de defesa das bactérias. Entre as enzimas mais importantes estão as despolimerases e as lisinas (Liu et al., 2022). As despolimerases são enzimas que conseguem degradar a matriz extracelular dos biofilmes, ao digerir a matriz extracelular, facilitam a penetração dos fagos nas camadas internas do biofilme, permitindo que alcancem as bactérias localizadas mais internamente no biofilme (Topka-Bielecka et al., 2021). Foi identificada uma diversidade de despolimerases em diferentes fagos, categorizadas em hidrolases e liases, que possuem diferentes mecanismos de degradação da EPS, conferindo-lhes uma grande especificidade e eficácia na desestabilização da estrutura do biofilme (Pires et al., 2016)

Os fagos produzem também as lisinas (ou endolisinas) estas enzimas causam a lise celular ao clivar o peptidoglicano da parede celular bacteriana, resultando na destruição das células hospedeiras e na libertação de novos fagos (Liu et al., 2022). Embora esta estratégia tenha mostrado potencial em estudos laboratoriais e em modelos experimentais, ainda não está aprovada e continua em constante desenvolvimento e investigação (Yang et al., 2023).



### III. CONCLUSÃO

Os biofilmes, como comunidades microbianas organizadas, estabelecem-se em superfícies diversas, incluindo tecidos humanos e dispositivos médicos, protegendo as bactérias dos mecanismos de defesa do hospedeiro e dos tratamentos antimicrobianos. Infecções associadas a biofilmes incluem infecções urinárias e pulmonares, mas também infecções associadas a dispositivos médicos, e destacam-se pela sua persistência e tolerância ao tratamento antibiótico, contribuindo para quadros clínicos difíceis de tratar e com alto risco de recorrência.

A complexidade das infecções associadas a biofilmes é amplificada pela capacidade destas comunidades de resistirem aos tratamentos convencionais, exigindo novas abordagens terapêuticas como agentes de *quorum quenching*, terapia fágica, e outras técnicas em desenvolvimento, que, embora promissoras, necessitam de mais estudos para validação clínica, aprovação e aplicação prática segura.

Assim, conclui-se que, apesar dos avanços no conhecimento e das alternativas terapêuticas emergentes, persiste a necessidade de investigação aprofundada para estabelecer protocolos eficazes e específicos para o diagnóstico e o tratamento de infecções associadas a biofilmes. A adoção de métodos de diagnóstico mais precisos e o desenvolvimento de terapias combinadas e direcionadas são passos essenciais para enfrentar o desafio crescente das infecções resistentes e recorrentes em contexto clínico.



## IV. BIBLIOGRAFIA

- Abbasian, S., Farahani, N. N., Mir, Z., Alinejad, F., Haeili, M., Dahmardehei, M., Mirzaii, M., Khoramrooz, S. S., Nasiri, M. J., & Darban-Sarokhalil, D. (2018). Genotypic characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from a burn centre by using agr, spa and SCCmec typing methods. *New Microbes and New Infections*, 26, 15–19. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2018.08.001>
- Achinas, S., Yska, S. K., Charalampogiannis, N., Krooneman, J., & Euverink, G. J. W. (2020). A Technological Understanding of Biofilm Detection Techniques: A Review. *Materials* 2020, Vol. 13, Page 3147, 13(14), 3147. <https://doi.org/10.3390/MA13143147>
- Al-Khatib, S. M., Stevenson, W. G., Ackerman, M. J., Bryant, W. J., Callans, D. J., Curtis, A. B., Deal, B. J., Dickfeld, T., Field, M. E., Fonarow, G. C., Gillis, A. M., Granger, C. B., Hammill, S. C., Hlatky, M. A., Joglar, J. A., Kay, G. N., Matlock, D. D., Myerburg, R. J., & Page, R. L. (2018). 2017 AHA/ACC/HRS Guideline for Management of Patients With Ventricular Arrhythmias and the Prevention of Sudden Cardiac Death: Executive Summary. *Circulation*, 138(13), e210–e271. <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000548>
- Alonzo, F., & Torres, V. J. (2014). The Bicomponent Pore-Forming Leucocidins of *Staphylococcus aureus*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 78(2), 199–230. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00055-13>
- Ameer, S., Ibrahim, H., Yaseen, M. U., Kulsoom, F., Cinti, S., & Sher, M. (2023). Electrochemical Impedance Spectroscopy-Based Sensing of Biofilms: A Comprehensive Review. *Biosensors* 2023, Vol. 13, Page 777, 13(8), 777. <https://doi.org/10.3390/BIOS13080777>
- Arciola, C. R., Campoccia, D., & Montanaro, L. (2018). Implant infections: adhesion, biofilm formation and immune evasion. *Nature Reviews Microbiology* 2018 16:7, 16(7), 397–409. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0019-y>
- Azeredo, J., Azevedo, N. F., Briandet, R., Cerca, N., Coenye, T., Costa, A. R., Desvaux, M., Di Bonaventura, G., Hébraud, M., Jaglic, Z., Kačániová, M., Knöchel, S., Lourenço, A., Mergulhão, F., Meyer, R. L., Nychas, G., Simões, M., Tresse, O., & Sternberg, C. (2017). Critical review on biofilm methods. *Critical Reviews in Microbiology*, 43(3), 313–351. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2016.1208146>
- Balducci, E., Papi, F., Capialdi, D. E., & Del Bino, L. (2023). Polysaccharides' Structures and Functions in Biofilm Architecture of Antimicrobial-Resistant (AMR) Pathogens. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 24, Issue 4). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/ijms24044030>

- Bamford, N. C., Macphee, C. E., & Stanley-Wall, N. R. (2023). Microbial Primer: An introduction to biofilms – what they are, why they form and their impact on built and natural environments. *Microbiology*, *169*(8), 1338. <https://doi.org/10.1099/MIC.0.001338>
- Banerjee, P., Singh, M., & Sharma, V. (2015). BIOFILM Formation: A Comprehensive Review. *International Journal of Pharma Research and Health Sciences*, *3*(2), 556–560. <https://doi.org/10.21276/ijprhs>
- Bassetti, M., Vena, A., Croxatto, A., Righi, E., & Guery, B. (2018). How to manage *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs in Context*, *7*, 212527. <https://doi.org/10.7573/dic.212527>
- Bjarnsholt, T., Ciofu, O., Molin, S., Givskov, M., & Høiby, N. (2013). Applying insights from biofilm biology to drug development - can a new approach be developed? *Nature Reviews. Drug Discovery*, *12*(10), 791–808. <https://doi.org/10.1038/NRD4000>
- Boase, S., Foreman, A., Cleland, E., Tan, L., Melton-Kreft, R., Pant, H., Hu, F. Z., Ehrlich, G. D., & Wormald, P. J. (2013). The microbiome of chronic rhinosinusitis: Culture, molecular diagnostics and biofilm detection. *BMC Infectious Diseases*, *13*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-210>
- Bohinc, K., Dražić, G., Fink, R., Oder, M., Jevšnik, M., Nipič, D., Godič-Torkar, K., & Raspor, P. (2014). Available surface dictates microbial adhesion capacity. *International Journal of Adhesion and Adhesives*, *50*, 265–272. <https://doi.org/10.1016/j.ijadhadh.2014.01.027>
- Brunelli, S. M., Van Wyck, D. B., Njord, L., Ziebol, R. J., Lynch, L. E., & Killion, D. P. (2018). Cluster-randomized trial of devices to prevent catheter-related bloodstream infection. *Journal of the American Society of Nephrology*, *29*(4), 1336–1343. <https://doi.org/10.1681/ASN.2017080870>
- Cahill, T. J., & Prendergast, B. D. (2016). Infective endocarditis. *The Lancet*, *387*(10021), 882–893. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)00067-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00067-7)
- Califf, R. M. (2018). Biomarker definitions and their applications. *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)*, *243*(3), 213–221. <https://doi.org/10.1177/1535370217750088>
- Campoccia, D., Montanaro, L., & Arciola, C. R. (2021). Extracellular DNA (eDNA). a major ubiquitous element of the bacterial biofilm architecture. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(16). <https://doi.org/10.3390/ijms22169100>
- Cantin, A. M., Hartl, D., Konstan, M. W., & Chmiel, J. F. (2015). Inflammation in cystic fibrosis lung disease: Pathogenesis and therapy. *Journal of Cystic Fibrosis*, *14*(4), 419–430. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2015.03.003>

- Chambliss, A. B., & Marzinke, M. A. (2020). Applications of molecular techniques in the clinical laboratory. *Contemporary Practice in Clinical Chemistry*, 337–349. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815499-1.00020-X>
- Chen, M., Yu, Q., & Sun, H. (2013). Novel Strategies for the Prevention and Treatment of Biofilm Related Infections. *International Journal of Molecular Sciences* 2013, Vol. 14, Pages 18488-18501, 14(9), 18488–18501. <https://doi.org/10.3390/IJMS140918488>
- Chen, Q., Shen, Y., & Zheng, J. (2021). A review of cystic fibrosis: Basic and clinical aspects. *Animal Models and Experimental Medicine*, 4(3), 220–232. <https://doi.org/10.1002/AME2.12180>
- Chmiel, J. F., Aksamit, T. R., Chotirmall, S. H., Dasenbrook, E. C., Elborn, J. S., LiPuma, J. J., Ranganathan, S. C., Waters, V. J., & Ratjen, F. A. (2014). Antibiotic management of lung infections in cystic fibrosis: I. The microbiome, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, gram-negative bacteria, and multiple infections. *Annals of the American Thoracic Society*, 11(7), 1120–1129. <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201402-050AS>
- Chu, C. M., & Lowder, J. L. (2018). Diagnosis and treatment of urinary tract infections across age groups. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 219(1), 40–51. <https://doi.org/10.1016/j.AJOG.2017.12.231>
- Cigana, C., Bernardini, F., Facchini, M., Alcalá-Franco, B., Riva, C., De Fino, I., Rossi, A., Ranucci, S., Misson, P., Chevalier, E., Brodmann, M., Schmitt, M., Wach, A., Dale, G. E., Obrecht, D., & Bragonzi, A. (2016). Efficacy of the novel antibiotic POL7001 in preclinical models of *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(8), 4991–5000. <https://doi.org/10.1128/AAC.00390-16>
- Ciofu, O., & Tolker-Nielsen, T. (2019). Tolerance and Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms to Antimicrobial Agents-How *P. aeruginosa* Can Escape Antibiotics. *Frontiers in Microbiology*, 10(MAY). <https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.00913>
- Condinho, M., Carvalho, B., Cruz, A., Pinto, S. N., Arraiano, C. M., & Pobre, V. (2023). The role of RNA regulators, quorum sensing and c-di-GMP in bacterial biofilm formation. *FEBS Open Bio*, 13(6), 975–991. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.13389>
- Costa-Orlandi, C. B., Sardi, J. C. O., Pitangui, N. S., de Oliveira, H. C., Scorzoni, L., Galeane, M. C., Medina-Alarcón, K. P., Melo, W. C. M. A., Marcelino, M. Y., Braz, J. D., Fusco-Almeida, A. M., & Mendes-Giannini, M. J. S. (2017). Fungal Biofilms and Polymicrobial Diseases. *Journal of Fungi*, 3(2), 22. <https://doi.org/10.3390/JOF3020022>

- Cox, G., Ejim, L., Stogios, P. J., Koteva, K., Bordeleau, E., Evdokimova, E., Sieron, A. O., Savchenko, A., Serio, A. W., Krause, K. M., & Wright, G. D. (2018). Plazomicin Retains Antibiotic Activity against Most Aminoglycoside Modifying Enzymes. *ACS Infectious Diseases*, 4(6), 980–987. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.8b00001>
- Das, T., Krom, B. P., Van Der Mei, H. C., Busscher, H. J., & Sharma, P. K. (2011). DNA-mediated bacterial aggregation is dictated by acid–base interactions. *Soft Matter*, 7(6), 2927–2935. <https://doi.org/10.1039/C0SM01142H>
- Delcaru, C., Alexandru, I., Podgoreanu, P., Grosu, M., Stavropoulos, E., Chifiriuc, M. C., & Lazar, V. (2016). Microbial Biofilms in Urinary Tract Infections and Prostatitis: Etiology, Pathogenicity, and Combating strategies. *Pathogens* 2016, Vol. 5, Page 65, 5(4), 65. <https://doi.org/10.3390/PATHOGENS5040065>
- Di Domenico, E. G., Oliva, A., & Guembe, M. (2022). The Current Knowledge on the Pathogenesis of Tissue and Medical Device-Related Biofilm Infections. *Microorganisms* 2022, Vol. 10, Page 1259, 10(7), 1259. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS10071259>
- Di Domenico, E. G., Oliva, A., & Guembe, M. (2024). Biofilm-Related Infections in Healthcare: Moving towards New Horizons. *Microorganisms* 2024, Vol. 12, Page 784, 12(4), 784. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS12040784>
- Diban, F., Di Lodovico, S., Di Fermo, P., D’Ercole, S., D’Arcangelo, S., Di Giulio, M., & Cellini, L. (2023). Biofilms in Chronic Wound Infections: Innovative Antimicrobial Approaches Using the In Vitro Lubbock Chronic Wound Biofilm Model. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 24, Issue 2). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms24021004>
- Everett, M. J., & Davies, D. T. (2021). Pseudomonas aeruginosa elastase (LasB) as a therapeutic target. *Drug Discovery Today*, 26(9), 2108–2123. <https://doi.org/10.1016/J.DRUDIS.2021.02.026>
- Ferrer, M. D., Rodriguez, J. C., Álvarez, L., Artacho, A., Royo, G., & Mira, A. (2017). Effect of antibiotics on biofilm inhibition and induction measured by real-time cell analysis. *Journal of Applied Microbiology*, 122(3), 640–650. <https://doi.org/10.1111/JAM.13368>
- Filipović, U., Dahmane, R. G., Ghannouchi, S., Zore, A., & Bohinc, K. (2020). Bacterial adhesion on orthopedic implants. *Advances in Colloid and Interface Science*, 283, 102228. <https://doi.org/10.1016/J.CIS.2020.102228>
- Fisher, R. A., Gollan, B., & Helaine, S. (2017). Persistent bacterial infections and persister cells. *Nature Reviews. Microbiology*, 15(8), 453–464. <https://doi.org/10.1038/NRMICRO.2017.42>

- Flemming, H. C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A., & Kjelleberg, S. (2016). Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews. Microbiology*, *14*(9), 563–575. <https://doi.org/10.1038/NRMICRO.2016.94>
- Flores-Mireles, A. L., Walker, J. N., Caparon, M., & Hultgren, S. J. (2015a). *Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options*. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3432>
- Flores-Mireles, A. L., Walker, J. N., Caparon, M., & Hultgren, S. J. (2015b). Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nature Reviews. Microbiology*, *13*(5), 269. <https://doi.org/10.1038/NRMICRO3432>
- Fokkens, W. J., Lund, V. J., Hopkins, C., Hellings, P. W., Kern, R., Reitsma, S., Toppila-Salmi, S., Bernalsprekelsen, M., & Mullol, J. (2020). Executive summary of EPOS 2020 including integrated care pathways. *Rhinology*, *58*(2), 82–111. <https://doi.org/10.4193/RHIN20.601>
- Fortuna, A., Collalto, D., Rampioni, G., & Leoni, L. (2024). Assays for Studying *Pseudomonas aeruginosa* Secreted Proteases. *Methods in Molecular Biology*, *2721*, 137–151. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3473-8\\_10](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3473-8_10)
- Foster, T. J., Geoghegan, J. A., Ganesh, V. K., & Höök, M. (2014). Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nature Reviews. Microbiology*, *12*(1), 49. <https://doi.org/10.1038/NRMICRO3161>
- Galdino, A. C. M., Branquinha, M. H., Santos, A. L. S., & Viganor, L. (2017). *Pseudomonas aeruginosa* and Its Arsenal of Proteases: Weapons to Battle the Host. *Pathophysiological Aspects of Proteases*, 381–397. [https://doi.org/10.1007/978-981-10-6141-7\\_16](https://doi.org/10.1007/978-981-10-6141-7_16)
- Gon, S., Kumar, K. N., Nüsslein, K., & Santore, M. M. (2012). How bacteria adhere to brushy PEG surfaces: Clinging to flaws and compressing the brush. *Macromolecules*, *45*(20), 8373–8381. <https://doi.org/10.1021/ma300981r>
- Grandclément, C., Tannières, M., Moréra, S., Dessaux, Y., & Faure, D. (2016). Quorum quenching: role in nature and applied developments. *FEMS Microbiology Reviews*, *40*(1), 86–116. <https://doi.org/10.1093/FEMSRE/FUV038>
- Grooters, K. E., Ku, J. C., Richter, D. M., Krinock, M. J., Minor, A., Li, P., Kim, A., Sawyer, R., & Li, Y. (2024). Strategies for combating antibiotic resistance in bacterial biofilms. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *14*, 1352273. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2024.1352273>
- Habib, G., Lancellotti, P., Antunes, M. J., Bongiorno, M. G., Casalta, J. P., Del Zotti, F., Dulgheru, R., El Khoury, G., Erba, P. A., Iung, B., Mirob, J. M., Mulder, B. J., Plonska-Gosciniak, E., Price, S., Roos-Hesselink, J., Snygg-Martin, U., Thuny, F., Mas, P. T., Vilacosta, I., ... Walker, D. M. (2015). 2015 ESC Guidelines for the management of infective endocarditis: The Task Force for the Management of

- Infective Endocarditis of the European Society of Cardiology (ESC). Endorsed by: European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS), the European Association of Nuclear Medicine (EANM). *European Heart Journal*, 36(44), 3075–3123. <https://doi.org/10.1093/EURHEARTJ/EHV319>
- Hall-Stoodley, L., & McCoy, K. S. (2022). Biofilm aggregates and the host airway-microbial interface. In *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.969326>
- Hemmati, J., Nazari, M., Abolhasani, F. S., Ahmadi, A., & Asghari, B. (2024). In vitro investigation of relationship between quorum-sensing system genes, biofilm forming ability, and drug resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Microbiology*, 24(1). <https://doi.org/10.1186/s12866-024-03249-w>
- Hemmati, J., Nazari, M., Ahmadi, A., Bayati, M., Jalili, M., Taheri, M., Mohammadi, Y., & Asghari, B. (2024). In vitro evaluation of biofilm phenotypic and genotypic characteristics among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Hamadan, West of Iran. *Journal of Applied Genetics*, 65(1), 213–222. <https://doi.org/10.1007/S13353-023-00811-6>
- Høiby, N. (2014). *A personal history of research on microbial biofilms and biofilm infections*. <https://doi.org/10.1111/2049-632X.12165>
- Høiby, N., Bjarnsholt, T., Moser, C., Bassi, G. L., Coenye, T., Donelli, G., Hall-Stoodley, L., Holá, V., Imbert, C., Kirketerp-Møller, K., Lebeaux, D., Oliver, A., Ullmann, A. J., Williams, C., ESCMID Study Group for Biofilms (ESGB), & Consulting External Expert Werner Zimmerli. (2015). ESCMID\* guideline for the diagnosis and treatment of biofilm infections 2014. *Clinical Microbiology and Infection*, 21(S1), S1–S25. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2014.10.024>
- Høiby, N., Moser, C., Oliver, A., Williams, C., Ramage, G., Borghi, E., Azeredo, J., & Macia, M. D. (2023). To update or not to update the ESCMID guidelines for the diagnosis and treatment of biofilm infections – That is the question! The opinion of the ESGB board. *Biofilm*, 6, 100135. <https://doi.org/10.1016/J.BIOFLM.2023.100135>
- Huang, C.-J., Wang, L.-C., Liu, C.-Y., Chiang, A. S. T., & Chang, Y.-C. (2014). Natural zwitterionic organosulfurs as surface ligands for antifouling and responsive properties. *Biointerphases*, 9(2). <https://doi.org/10.1116/1.4869300/133823>
- Huang, Y., Chakraborty, S., & Liang, H. (2020). Methods to probe the formation of biofilms: Applications in foods and related surfaces. In *Analytical Methods* (Vol. 12, Issue 4, pp. 416–432). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/c9ay02214g>
- Idrees, M., Sawant, S., Karodia, N., & Rahman, A. (2021). *Staphylococcus aureus Biofilm: Morphology, Genetics, Pathogenesis and Treatment Strategies*.

*International Journal of Environmental Research and Public Health* 2021, Vol. 18, Page 7602, 18(14), 7602. <https://doi.org/10.3390/IJERPH18147602>

- Ivanovic, B., Trifunovic, D., Matic, S., Petrovic, J., Sacic, D., & Tadic, M. (2019). Prosthetic valve endocarditis - A trouble or a challenge? *Journal of Cardiology*, 73(2), 126–133. <https://doi.org/10.1016/J.JJCC.2018.08.007>
- Jain, S. K. (2017). The Promise of Molecular Imaging in the Study and Treatment of Infectious Diseases. *Molecular Imaging and Biology*, 19(3), 341–347. <https://doi.org/10.1007/S11307-017-1055-0>
- Jamal, M., Ahmad, W., Andleeb, S., Jalil, F., Imran, M., Nawaz, M. A., Hussain, T., Ali, M., Rafiq, M., & Kamil, M. A. (2018). Bacterial biofilm and associated infections. In *Journal of the Chinese Medical Association* (Vol. 81, Issue 1, pp. 7–11). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.jcma.2017.07.012>
- Jangra, V., Sharma, N., & Chhillar, A. K. (2022). Therapeutic approaches for combating *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Microbes and Infection*, 24(4), 104950. <https://doi.org/10.1016/J.MICINF.2022.104950>
- Jennings, L. K., Storek, K. M., Ledvina, H. E., Coulon, C., Marmont, L. S., Sadovskaya, I., Secor, P. R., Tseng, B. S., Scian, M., Filloux, A., Wozniak, D. J., Howell, P. L., & Parsek, M. R. (2015). Pel is a cationic exopolysaccharide that cross-links extracellular DNA in the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(36), 11353–11358. <https://doi.org/doi.org/10.1073/pnas.1503058112>
- Jones, C. J., & Wozniak, D. J. (2017). Psl Produced by Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* Contributes to the Establishment of Biofilms and Immune Evasion. *MBio*, 8(3). <https://doi.org/10.1128/MBIO.00864-17>
- Jurado-Martín, I., Sainz-Mejías, M., & McClean, S. (2021). *Pseudomonas aeruginosa*: An Audacious Pathogen with an Adaptable Arsenal of Virulence Factors. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(6), 1–37. <https://doi.org/10.3390/IJMS22063128>
- Kapoor, G., Saigal, S., & Elongavan, A. (2017). Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *Journal of Anaesthesiology, Clinical Pharmacology*, 33(3), 300–305. [https://doi.org/10.4103/JOACP.JOACP\\_349\\_15](https://doi.org/10.4103/JOACP.JOACP_349_15)
- Kavanaugh, J. S., & Horswill, A. R. (2016). Impact of environmental cues on staphylococcal quorum sensing and biofilm development. *Journal of Biological Chemistry*, 291(24), 12556–12564. <https://doi.org/10.1074/jbc.R116.722710>
- Khatoon, Z., McTiernan, C. D., Suuronen, E. J., Mah, T. F., & Alarcon, E. I. (2018). Bacterial biofilm formation on implantable devices and approaches to its treatment and prevention. *Heliyon*, 4(12), e01067. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e01067>

- Kim, B. H., Yang, J., Lee, D., Choi, B. K., Hyeon, T., & Park, J. (2018). Liquid-Phase Transmission Electron Microscopy for Studying Colloidal Inorganic Nanoparticles. *Advanced Materials (Deerfield Beach, Fla.)*, 30(4). <https://doi.org/10.1002/ADMA.201703316>
- Kim, M. K., Ingremeau, F., Zhao, A., Bassler, B. L., & Stone, H. A. (2016). Local and global consequences of flow on bacterial quorum sensing. *Nature Microbiology*, 1(1). <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2015.5>
- Klančnik, A., Toplak, N., Kovač, M., Marquis, H., & Jeršek, B. (2015). Quantification of *Listeria monocytogenes* cells with digital PCR and their biofilm cells with real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods*, 118, 37–41. <https://doi.org/10.1016/J.MIMET.2015.08.012>
- Kline, K. A., & Lewis, A. L. (2016). Gram-Positive Uropathogens, Polymicrobial Urinary Tract Infection, and the Emerging Microbiota of the Urinary Tract. *Microbiology Spectrum*, 4(2). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.uti-0012-2012>
- Konstan, M. W., Flume, P. A., Kappler, M., Chiron, R., Higgins, M., Brockhaus, F., Zhang, J., Angyalosi, G., He, E., & Geller, D. E. (2011). Safety, efficacy and convenience of tobramycin inhalation powder in cystic fibrosis patients: The EAGER trial. *Journal of Cystic Fibrosis: Official Journal of the European Cystic Fibrosis Society*, 10(1), 54–61. <https://doi.org/10.1016/J.JCF.2010.10.003>
- Kotalczyk, A., Kalarus, Z., Wright, D. J., Boriani, G., & Lip, G. Y. H. (2020). Cardiac Electronic Devices: Future Directions and Challenges. *Medical Devices (Auckland, N.Z.)*, 13, 325–338. <https://doi.org/10.2147/MDER.S245625>
- Kucera, J., Sojka, M., Pavlik, V., Szuszkiewicz, K., Velebny, V., & Klein, P. (2014). Multispecies biofilm in an artificial wound bed--A novel model for in vitro assessment of solid antimicrobial dressings. *Journal of Microbiological Methods*, 103, 18–24. <https://doi.org/10.1016/J.MIMET.2014.05.008>
- Laarman, A. J., Bardoel, B. W., Ruyken, M., Fernie, J., Milder, F. J., van Strijp, J. A. G., & Rooijackers, S. H. M. (2012). *Pseudomonas aeruginosa* Alkaline Protease Blocks Complement Activation via the Classical and Lectin Pathways. *The Journal of Immunology*, 188(1), 386–393. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.1102162>
- Lacey, K. A., Leech, J. M., Lalor, S. J., McCormack, N., Geoghegan, J. A., & McLoughlin, R. M. (2017). The *Staphylococcus aureus* cell wall-anchored protein clumping factor A is an important T cell antigen. *Infection and Immunity*, 85(12). <https://doi.org/10.1128/IAI.00549-17>
- Le, K. Y., & Otto, M. (2015). Quorum-sensing regulation in staphylococci-an overview. *Frontiers in Microbiology*, 6(OCT). <https://doi.org/10.3389/FMICB.2015.01174>

- Lee, J., & Zhang, L. (2015). The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein & Cell*, 6(1), 26–41. <https://doi.org/10.1007/S13238-014-0100-X>
- Liao, C., Huang, X., Wang, Q., Yao, D., & Lu, W. (2022). Virulence Factors of *Pseudomonas Aeruginosa* and Antivirulence Strategies to Combat Its Drug Resistance. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12, 926758. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2022.926758>
- Liao, W. C., Chung, W. S., Lo, Y. C., Shih, W. H., Chou, C. H., Chen, C. Y., Tu, C. Y., & Ho, M. W. (2022). Changing epidemiology and prognosis of nosocomial bloodstream infection: A single-center retrospective study in Taiwan. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 55(6), 1293–1300. <https://doi.org/10.1016/J.JMII.2021.09.015>
- Lila, A. S. A., Rajab, A. A. H., Abdallah, M. H., Rizvi, S. M. D., Moin, A., Khafagy, E. S., Tabrez, S., & Hegazy, W. A. H. (2023a). Biofilm Lifestyle in Recurrent Urinary Tract Infections. *Life*, 13(1), 148. <https://doi.org/10.3390/LIFE13010148>
- Lila, A. S. A., Rajab, A. A. H., Abdallah, M. H., Rizvi, S. M. D., Moin, A., Khafagy, E. S., Tabrez, S., & Hegazy, W. A. H. (2023b). Biofilm Lifestyle in Recurrent Urinary Tract Infections. In *Life* (Vol. 13, Issue 1). MDPI. <https://doi.org/10.3390/life13010148>
- Limoli, D. H., Jones, C. J., & Wozniak, D. J. (2015). Bacterial Extracellular Polysaccharides in Biofilm Formation and Function. *Microbiology Spectrum*, 3(3). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.mb-0011-2014>
- Liu, S., Lu, H., Zhang, S., Shi, Y., & Chen, Q. (2022). Phages against Pathogenic Bacterial Biofilms and Biofilm-Based Infections: A Review. *Pharmaceutics*, 14(2). <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS14020427>
- Lu, L., Li, M., Yi, G., Liao, L., Cheng, Q., Zhu, J., Zhang, B., Wang, Y., Chen, Y., & Zeng, M. (2022). Screening strategies for quorum sensing inhibitors in combating bacterial infections. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 12(1), 1–14. <https://doi.org/10.1016/J.JPHA.2021.03.009>
- Magar, H. S., Hassan, R. Y. A., & Mulchandani, A. (2021). Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS): Principles, Construction, and Biosensing Applications. *Sensors* 2021, Vol. 21, Page 6578, 21(19), 6578. <https://doi.org/10.3390/S21196578>
- Manandhar, S., Singh, A., Varma, A., Pandey, S., & Shrivastava, N. (2018). Evaluation of methods to detect in vitro biofilm formation by staphylococcal clinical isolates. *BMC Research Notes*, 11(1), 1–6. <https://doi.org/10.1186/s13104-018-3820-9>
- Mantero, M., Gramegna, A., Pizzamiglio, G., D’Adda, A., Tarsia, P., & Blasi, F. (2017). Once daily aerosolised tobramycin in adult patients with cystic fibrosis in the

- management of *Pseudomonas aeruginosa* chronic infection. *Multidisciplinary Respiratory Medicine*, 12(1), 1–4. <https://doi.org/10.1186/S40248-016-0083-Y>
- Martin, I., Waters, V., & Grasmann, H. (2021). Approaches to Targeting Bacterial Biofilms in Cystic Fibrosis Airways. *International Journal of Molecular Sciences* 2021, Vol. 22, Page 2155, 22(4), 2155. <https://doi.org/10.3390/IJMS22042155>
- McLellan, L. K., & Hunstad, D. A. (2016). Urinary Tract Infection: Pathogenesis and Outlook. *Trends in Molecular Medicine*, 22(11), 946–957. <https://doi.org/10.1016/J.MOLMED.2016.09.003>
- Melaugh, G., Martinez, V. A., Baker, P., Hill, P. J., Howell, P. L., Wozniak, D. J., & Allen, R. J. (2023). Distinct types of multicellular aggregates in *Pseudomonas aeruginosa* liquid cultures. *Npj Biofilms and Microbiomes*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41522-023-00412-5>
- Miao, J., Lin, S., Soteyome, T., Peters, B. M., Li, Y., Chen, H., Su, J., Li, L., Li, B., Xu, Z., Shirliff, M. E., & harro, J. M. (2019). Biofilm Formation of *Staphylococcus aureus* under Food Heat Processing Conditions: First Report on CML Production within Biofilm. *Scientific Reports* 2019 9:1, 9(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35558-2>
- Mirzaei, R., Mohammadzadeh, R., Alikhani, M. Y., Shokri Moghadam, M., Karampoor, S., Kazemi, S., Barfipoursalar, A., & Yousefimashouf, R. (2020). The biofilm-associated bacterial infections unrelated to indwelling devices. In *IUBMB Life* (Vol. 72, Issue 7, pp. 1271–1285). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1002/iub.2266>
- Miyae, S., Suzuki, E., Komiyama, Y., Kondo, Y., Morikawa, M., & Maeda, S. (2018). Bacterial memory of persisters: Bacterial persister cells can retain their phenotype for days or weeks after withdrawal from colony-biofilm culture. *Frontiers in Microbiology*, 9(JUN), 379354. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01396>
- Mohan, M. S., Salim, S. A., Forgia, N., & Busi, S. (2024). *Pseudomonas aeruginosa* Virulence Factors and Biofilm Components: Synthesis, Structure, Function and Inhibitors. *ESKAPE Pathogens*, 317–347. [https://doi.org/10.1007/978-981-99-8799-3\\_11](https://doi.org/10.1007/978-981-99-8799-3_11)
- Mohammed, S. A., Vianna, M. E., Penny, M. R., Hilton, S. T., Mordan, N., & Knowles, J. C. (2017). Confocal laser scanning, scanning electron, and transmission electron microscopy investigation of *Enterococcus faecalis* biofilm degradation using passive and active sodium hypochlorite irrigation within a simulated root canal model. *MicrobiologyOpen*, 6(4). <https://doi.org/10.1002/MBO3.455>
- Montanaro, L., Speziale, P., Campoccia, D., Ravaioli, S., Cangini, I., Pietrocola, G., Giannini, S., & Arciola, C. R. (2011). Scenery of *Staphylococcus* Implant Infections in Orthopedics. *Future Microbiology*, 6(11), 1329–1349. <https://doi.org/10.2217/FMB.11.117>

- Morelli, T., Stella, M., Barros, S. P., Marchesan, J. T., Moss, K. L., Kim, S. J., Yu, N., Aspiras, M. B., Ward, M., & Offenbacher, S. (2014). Salivary biomarkers in a biofilm overgrowth model. *Journal of Periodontology*, *85*(12), 1770–1778. <https://doi.org/10.1902/JOP.2014.140180>
- Muthukrishnan, G., Masters, E. A., Daiss, J. L., & Schwarz, E. M. (2019). Mechanisms of Immune Evasion and Bone Tissue Colonization That Make *Staphylococcus aureus* the Primary Pathogen in Osteomyelitis. *Current Osteoporosis Reports*, *17*(6), 395–404. <https://doi.org/10.1007/s11914-019-00548-4>
- Nguyen, A. T., & Oglesby-Sherrouse, A. G. (2016). Interactions between *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* during co-cultivations and polymicrobial infections. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *100*(14), 6141–6148. <https://doi.org/10.1007/S00253-016-7596-3>
- Nguyen, H. T. T., Nguyen, T. H., & Otto, M. (2020). The staphylococcal exopolysaccharide PIA - Biosynthesis and role in biofilm formation, colonization, and infection. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, *18*, 3324–3334. <https://doi.org/10.1016/J.CSBJ.2020.10.027>
- Nicolle, L. E. (2014). Catheter associated urinary tract infections. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, *3*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/2047-2994-3-23>
- Niu, H., Gu, J., & Zhang, Y. (2024). Bacterial persisters: molecular mechanisms and therapeutic development. *Signal Transduction and Targeted Therapy* *2024 9:1*, *9*(1), 1–32. <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01866-5>
- Nourbakhsh, F., & Namvar, A. E. (2016). Detection of genes involved in biofilm formation in *Staphylococcus aureus* isolates. *GMS Hygiene and Infection Control*, *11*, Doc07. <https://doi.org/10.3205/DGKH000267>
- Oder, M., Fink, R., Bohinc, K., & Torkar, K. G. (2017). The influence of shear stress on the adhesion capacity of *Legionella pneumophila*. *Arhiv Za Higijenu Rada i Toksikologiju*, *68*(2), 109–115. <https://doi.org/10.1515/AIHT-2017-68-2904>
- Oliva, A., Miele, M. C., Al Ismail, D., Di Timoteo, F., De Angelis, M., Rosa, L., Cutone, A., Venditti, M., Mascellino, M. T., Valenti, P., & Mastroianni, C. M. (2021). Challenges in the Microbiological Diagnosis of Implant-Associated Infections: A Summary of the Current Knowledge. *Frontiers in Microbiology*, *12*, 750460. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2021.750460>
- Oliveira, D., Borges, A., & Simões, M. (2018). *toxins Staphylococcus aureus Toxins and Their Molecular Activity in Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.3390/toxins10060252>
- Otto, M. (2014). *Staphylococcus aureus* toxins. *Current Opinion in Microbiology*, *17*(1), 32–37. <https://doi.org/10.1016/J.MIB.2013.11.004>

- Oumer, Y., Dadi, B. R., Seid, M., Biresaw, G., & Manilal, A. (2021). Catheter-Associated Urinary Tract Infection: Incidence, Associated Factors and Drug Resistance Patterns of Bacterial Isolates in Southern Ethiopia. *Infection and Drug Resistance*, *14*, 2883–2894. <https://doi.org/10.2147/IDR.S311229>
- Percival, S. L., Suleman, L., Vuotto, C., & Donelli, G. (2015). Healthcare-Associated infections, medical devices and biofilms: Risk, tolerance and control. *Journal of Medical Microbiology*, *64*(4), 323–334. <https://doi.org/10.1099/JMM.0.000032>
- Pietrocola, G., Campoccia, D., Motta, C., Montanaro, L., Arciola, C. R., & Speziale, P. (2022). Colonization and Infection of Indwelling Medical Devices by *Staphylococcus aureus* with an Emphasis on Orthopedic Implants. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 23, Issue 11). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms23115958>
- Pietrocola, G., Nobile, G., Alfeo, M. J., Foster, T. J., Geoghegan, J. A., De Filippis, V., & Speziale, P. (2019). Fibronectin-binding protein B (FnBPB) from *Staphylococcus aureus* protects against the antimicrobial activity of histones. *Journal of Biological Chemistry*, *294*(10), 3588–3602. <https://doi.org/https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.005707>
- Pires, D. P., Oliveira, H., Melo, L. D. R., Sillankorva, S., & Azeredo, J. (2016). Bacteriophage-encoded depolymerases: their diversity and biotechnological applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *100*(5), 2141–2151. <https://doi.org/10.1007/S00253-015-7247-0>
- Pouget, C., Dunyach-Remy, C., Pantel, A., Schuldiner, S., Sotto, A., & Lavigne, J. P. (2020). Biofilms in Diabetic Foot Ulcers: Significance and Clinical Relevance. *Microorganisms* *2020*, Vol. 8, Page 1580, *8*(10), 1580. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS8101580>
- Prinzi, A., & Rohde, R. (2023, April). *The Role of Bacterial Biofilms in Antimicrobial Resistance*. American Society of Microbiology. <https://asm.org/Articles/2023/March/The-Role-of-Bacterial-Biofilms-in-Antimicrobial-Re>
- Quave, C. L., & Horswill, A. R. (2014). Flipping the switch: Tools for detecting small molecule inhibitors of staphylococcal virulence. *Frontiers in Microbiology*, *5*(DEC), 119582. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2014.00706>
- Queenan, A. M., Shang, W., Flamm, R., & Bush, K. (2010). Hydrolysis and inhibition profiles of  $\beta$ -lactamases from molecular classes A to D with doripenem, imipenem, and meropenem. *Volume 54, Issue 1, Pages 565 - 569*, *54*(1), 565–569. <https://doi.org/10.1128/AAC.01004-09>
- Rabin, N., Zheng, Y., Opoku-Temeng, C., Du, Y., Bonsu, E., & Sintim, H. O. (2015). Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. In

- Future Medicinal Chemistry* (Vol. 7, Issue 4, pp. 493–512). Future Science Ltd. <https://doi.org/10.4155/fmc.15.6>
- Rajapaksha, P., Elbourne, A., Gangadoo, S., Brown, R., Cozzolino, D., & Chapman, J. (2019). A review of methods for the detection of pathogenic microorganisms. *Analyst*, *144*(2), 396–411. <https://doi.org/10.1039/C8AN01488D>
- Rather, M. A., Gupta, K., & Mandal, M. (2021). Microbial biofilm: formation, architecture, antibiotic resistance, and control strategies. In *Brazilian Journal of Microbiology* (Vol. 52, Issue 4, pp. 1701–1718). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s42770-021-00624-x>
- Rehman, Z. U., & Leiknes, T. O. (2018). Quorum-quenching bacteria isolated from red sea sediments reduce biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in Microbiology*, *9*(JUL), 302767. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2018.01354>
- Rubio-Canalejas, A., Baelo, A., Herbera, S., Blanco-Cabra, N., Vukomanovic, M., & Torrents, E. (2022). 3D spatial organization and improved antibiotic treatment of a *Pseudomonas aeruginosa*–*Staphylococcus aureus* wound biofilm by nanoparticle enzyme delivery. *Frontiers in Microbiology*, *13*, 959156. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2022.959156>
- Sabih, A., & Leslie, S. W. (2023). Complicated Urinary Tract Infections. *StatPearls*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK436013/>
- Schilcher, K., & Horswill, A. R. (2020). *Staphylococcal Biofilm Development: Structure, Regulation, and Treatment Strategies*. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00026-19>
- Schlafer, S., & Meyer, R. L. (2017). Confocal microscopy imaging of the biofilm matrix. *Journal of Microbiological Methods*, *138*, 50–59. <https://doi.org/10.1016/J.MIMET.2016.03.002>
- Schulze, A., Mitterer, F., Pombo, J. P., & Schild, S. (2021). Biofilms by bacterial human pathogens: Clinical relevance - Development, composition and regulation - Therapeutical strategies. *Microbial Cell*, *8*(2), 28–56. <https://doi.org/10.15698/MIC2021.02.741>
- Schuster, J. J., & Markx, G. H. (2014). Biofilm architecture. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, *146*, 77–96. [https://doi.org/10.1007/10\\_2013\\_248](https://doi.org/10.1007/10_2013_248)
- Serra, R., Grande, R., Butrico, L., Rossi, A., Settimio, U. F., Caroleo, B., Amato, B., Gallelli, L., & De Franciscis, S. (2015). Chronic wound infections: the role of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, *13*(5), 605–613. <https://doi.org/10.1586/14787210.2015.1023291>
- Shahmoradi, M., Faridifar, P., Shapouri, R., Mousavi, S. F., Ezzedin, M., & Mirzaei, B. (2019). Determining the Biofilm Forming Gene Profile of *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates via Multiplex Colony PCR Method. *Reports of Biochemistry & Molecular Biology*, *7*(2), 181. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6374067/>

- Sharma, D., Misba, L., & Khan, A. U. (2019). Antibiotics versus biofilm: an emerging battleground in microbial communities. *Antimicrobial Resistance & Infection Control* 2019 8:1, 8(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/S13756-019-0533-3>
- Sharma, S., Mohler, J., Mahajan, S. D., Schwartz, S. A., Bruggemann, L., & Aalinkeel, R. (2023). Microbial Biofilm: A Review on Formation, Infection, Antibiotic Resistance, Control Measures, and Innovative Treatment. In *Microorganisms* (Vol. 11, Issue 6). MDPI. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11061614>
- Shirley, M. (2018). Ceftazidime-Avibactam: A Review in the Treatment of Serious Gram-Negative Bacterial Infections. *Drugs*, 78(6), 675–692. <https://doi.org/10.1007/s40265-018-0902-x>
- Shukla, S. K., & Rao, T. S. (2017). *An Improved Crystal Violet Assay for Biofilm Quantification in 96-Well Microtitre Plate*. <https://doi.org/10.1101/100214>
- Silva, N. B. S., Marques, L. A., & Röder, D. D. B. (2021a). Diagnosis of biofilm infections: current methods used, challenges and perspectives for the future. *Journal of Applied Microbiology*, 131(5), 2148–2160. <https://doi.org/10.1111/JAM.15049>
- Silva, N. B. S., Marques, L. A., & Röder, D. D. B. (2021b). Diagnosis of biofilm infections: current methods used, challenges and perspectives for the future. *Journal of Applied Microbiology*, 131(5), 2148–2160. <https://doi.org/10.1111/JAM.15049>
- Silver Spring (MD): Food and Drug Administration (US); Bethesda (MD): National Institutes of Health (US). (2016). BEST (Biomarkers, EndpointS, and other Tools) Resource. *BEST ( Biomarkers , EndpointS , and Other Tools ) Resource*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK326791/>
- Sionov, R. V., & Steinberg, D. (2022). Targeting the Holy Triangle of Quorum Sensing, Biofilm Formation, and Antibiotic Resistance in Pathogenic Bacteria. In *Microorganisms* (Vol. 10, Issue 6). MDPI. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10061239>
- Srivastava, S., & Bhargava, A. (2016). Biofilms and human health. *Biotechnology Letters*, 38(1), 1–22. <https://doi.org/10.1007/S10529-015-1960-8>
- Stefaniuk, E., Suchocka, U., Bosacka, K., & Hryniewicz, W. (2016). Etiology and antibiotic susceptibility of bacterial pathogens responsible for community-acquired urinary tract infections in Poland. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 35(8), 1363–1369. <https://doi.org/10.1007/S10096-016-2673-1>
- Streeter, K., & Katouli, M. (2016). *Pseudomonas aeruginosa*: A review of their Pathogenesis and Prevalence in Clinical Settings and the Environment. *Infection, Epidemiology and Medicine*, 2(1), 25–32. <https://doi.org/10.18869/modares.iem.2.1.25>
- Sugimoto, S., Okuda, K. I., Miyakawa, R., Sato, M., Arita-Morioka, K. I., Chiba, A., Yamanaka, K., Ogura, T., Mizunoe, Y., & Sato, C. (2016). Imaging of bacterial

- multicellular behaviour in biofilms in liquid by atmospheric scanning electron microscopy. *Scientific Reports* 2016 6:1, 6(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep25889>
- Tam, K., & Torres, V. J. (2019a). Staphylococcus aureus Secreted Toxins and Extracellular Enzymes. *Microbiology Spectrum*, 7(2). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0039-2018>
- Tam, K., & Torres, V. J. (2019b). Staphylococcus aureus Secreted Toxins and Extracellular Enzymes. *Microbiology Spectrum*, 7(2). <https://doi.org/10.1128/MICROBIOLSPEC.GPP3-0039-2018>
- Tan, H. L., Chai, L. Y. A., Yeo, T. C., Chia, B. L., Tambyah, P. A., & Poh, K. K. (2015). Predictors of in-hospital adverse events in patients with prosthetic valve infective endocarditis. *Heart Lung and Circulation*, 24(7), 705–709. <https://doi.org/10.1016/J.HLC.2015.01.013>
- Tan, K. Sen, Yan, Y., Ong, H. H., Chow, V. T. K., Shi, L., & Wang, D. Y. (2017). Impact of Respiratory Virus Infections in Exacerbation of Acute and Chronic Rhinosinusitis. *Current Allergy and Asthma Reports*, 17(4), 1–8. <https://doi.org/10.1007/s11882-017-0693-2>
- Tande, A. J., & Patel, R. (2014). Prosthetic joint infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(2), 302–345. <https://doi.org/10.1128/CMR.00111-13>
- Thi, M. T. T., Wibowo, D., & Rehm, B. H. A. (2020). Pseudomonas aeruginosa Biofilms. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(22), 1–25. <https://doi.org/10.3390/IJMS21228671>
- Topka-Bielecka, G., Dydecka, A., Necel, A., Bloch, S., Nejman-Faleńczyk, B., Węgrzyn, G., & Węgrzyn, A. (2021). Bacteriophage-Derived Depolymerases against Bacterial Biofilm. *Antibiotics* 2021, Vol. 10, Page 175, 10(2), 175. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS10020175>
- Touchette, M. H., Holsclaw, C. M., Previti, M. L., Solomon, V. C., Leary, J. A., Bertozzi, C. R., & Seeliger, J. C. (2015). Structure-based functional characterization of repressor of toxin (Rot), a central regulator of Staphylococcus aureus virulence. *Journal of Bacteriology*, 197(1), 188–200. <https://doi.org/10.1128/JB.02317-14>
- Tullis, D. E., Burns, J. L., Retsch-Bogart, G. Z., Bresnik, M., Henig, N. R., Lewis, S. A., & LiPuma, J. J. (2014). Inhaled aztreonam for chronic Burkholderia infection in cystic fibrosis: a placebo-controlled trial. *Journal of Cystic Fibrosis: Official Journal of the European Cystic Fibrosis Society*, 13(3), 296–305. <https://doi.org/10.1016/J.JCF.2013.08.011>
- Uneputty, A., Dávila-Lezama, A., Garibo, D., Oknianska, A., Bogdanchikova, N., Hernández-Sánchez, J. F., & Susarrey-Arce, A. (2022). Strategies applied to modify structured and smooth surfaces: A step closer to reduce bacterial adhesion and

- biofilm formation. *Colloid and Interface Science Communications*, 46, 100560. <https://doi.org/10.1016/J.COLCOM.2021.100560>
- Vaibhav Sande, S., & Santosh Debnath, A. (2020). Comparison of the Three Phenotypic Methods to Detect Biofilm Production in Coagulase Negative Staphylococci. *Original Research Article J. Evolution Med. Dent. Sci*, 9. <https://doi.org/10.14260/jemds/2020/299>
- Vandana, & Das, S. (2021). Structural and mechanical characterization of biofilm-associated bacterial polymer in the emulsification of petroleum hydrocarbon. 3 *Biotech*, 11(5). <https://doi.org/10.1007/s13205-021-02795-8>
- Vega-Hernández, R., Ochoa, S. A., Valle-Rios, R., Jaimes-Ortega, G. A., Arellano-Galindo, J., Aparicio-Ozores, G., Ibarra, J. A., Hernández-Castro, R., Cruz-Córdova, A., & Xicohtencatl-Cortes, J. (2021). Flagella, Type I Fimbriae and Curli of Uropathogenic Escherichia coli Promote the Release of Proinflammatory Cytokines in a Coculture System. *Microorganisms*, 9(11). <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS9112233>
- Venkataraman, R., & Yadav, U. (2023). Catheter-associated urinary tract infection: An overview. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, 34(1), 5–10. <https://doi.org/10.1515/JBCPP-2022-0152>
- Vestby, L. K., Grønseth, T., Simm, R., & Nesse, L. L. (2020). Bacterial biofilm and its role in the pathogenesis of disease. In *Antibiotics* (Vol. 9, Issue 2). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9020059>
- Vetrivel, A., Ramasamy, M., Vetrivel, P., Natchimuthu, S., Arunachalam, S., Kim, G.-S., & Murugesan, R. (2021). Pseudomonas aeruginosa Biofilm Formation and Its Control. *Biologics*, 1(3), 312–336. <https://doi.org/10.3390/biologics1030019>
- Vinodhini, V., & Kavitha, M. (2024). Deciphering agr quorum sensing in Staphylococcus aureus: insights and therapeutic prospects. In *Molecular Biology Reports* (Vol. 51, Issue 1). Springer Science and Business Media B.V. <https://doi.org/10.1007/s11033-023-08930-3>
- Wainwright, J., Hobbs, G., & Nakouti, I. (2021). Persister cells: formation, resuscitation and combative therapies. In *Archives of Microbiology* (Vol. 203, Issue 10, pp. 5899–5906). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02585-z>
- Wang, B., & Muir, T. W. (2016). Regulation of Virulence in Staphylococcus aureus: Molecular Mechanisms and Remaining Puzzles. *Cell Chemical Biology*, 23(2), 214–224. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMBIOL.2016.01.004>
- Waters, V., Atenafu, E. G., Lu, A., Yau, Y., Tullis, E., & Ratjen, F. (2013). Chronic Stenotrophomonas maltophilia infection and mortality or lung transplantation in

- cystic fibrosis patients. *Journal of Cystic Fibrosis : Official Journal of the European Cystic Fibrosis Society*, 12(5), 482–486. <https://doi.org/10.1016/J.JCF.2012.12.006>
- Wei, D., Zhu, X. M., Chen, Y. Y., Li, X. Y., Chen, Y. P., Liu, H. Y., & Zhang, M. (2019). Chronic wound biofilms: Diagnosis and therapeutic strategies. *Chinese Medical Journal*, 132(22), 2737–2744. <https://doi.org/10.1097/CM9.0000000000000523>
- Williams, P., & Cámara, M. (2009). Quorum sensing and environmental adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: a tale of regulatory networks and multifunctional signal molecules. *Current Opinion in Microbiology*, 12(2), 182–191. <https://doi.org/10.1016/J.MIB.2009.01.005>
- Wu, Y. K., Cheng, N. C., & Cheng, C. M. (2019). Biofilms in Chronic Wounds: Pathogenesis and Diagnosis. In *Trends in Biotechnology* (Vol. 37, Issue 5, pp. 505–517). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.10.011>
- Xu, Y., Dhaouadi, Y., Stoodley, P., & Ren, D. (2020). Sensing the unreachable: challenges and opportunities in biofilm detection. *Current Opinion in Biotechnology*, 64, 79–84. <https://doi.org/10.1016/J.COPBIO.2019.10.009>
- Yan, J., & Bassler, B. L. (2019). Surviving as a Community: Antibiotic Tolerance and Persistence in Bacterial Biofilms. In *Cell Host and Microbe* (Vol. 26, Issue 1, pp. 15–21). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.06.002>
- Yang, L., Hu, Y., Liu, Y., Zhang, J., Ulstrup, J., & Molin, S. (2011). Distinct roles of extracellular polymeric substances in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Environmental Microbiology*, 13(7), 1705–1717. <https://doi.org/10.1111/J.1462-2920.2011.02503.X>
- Yang, Q., Le, S., Zhu, T., & Wu, N. (2023). Regulations of phage therapy across the world. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1250848. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2023.1250848>
- Zhanel, G. G., Chung, P., Adam, H., Zelenitsky, S., Denisuik, A., Schweizer, F., Lagacé-Wiens, P. R. S., Rubinstein, E., Gin, A. S., Walkty, A., Hoban, D. J., Lynch, J. P., & Karlowsky, J. A. (2014). Ceftolozane/tazobactam: A novel cephalosporin/ $\beta$ -lactamase inhibitor combination with activity against multidrug-resistant gram-negative bacilli. *Drugs*, 74(1), 31–51. <https://doi.org/10.1007/s40265-013-0168-2>
- Zhao, A., Sun, J., & Liu, Y. (2023). Understanding bacterial biofilms: From definition to treatment strategies. In *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* (Vol. 13). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1137947>
- Zhao, X., Zhao, F., Wang, J., & Zhong, N. (2017). Biofilm formation and control strategies of foodborne pathogens: Food safety perspectives. In *RSC Advances* (Vol. 7, Issue 58, pp. 36670–36683). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/c7ra02497e>

Zhu, X., Jańczewski, D., Guo, S., Lee, S. S. C., Parra Velandia, F. J., Teo, S. L. M., He, T., Puniredd, S. R., & Julius Vancso, G. (2015). Polyion multilayers with precise surface charge control for antifouling. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 7(1), 852–861. <https://doi.org/10.1021/am507371a>