

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Faculdade De Farmácia

Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia

**TÉCNICAS DE DETERMINAÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME
MICROBIANO.**

IGOR OLIVEIRA PALAGI DE SOUZA

Porto Alegre, 10 de junho de 2013.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Faculdade De Farmácia

Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia

**TÉCNICAS DE DETERMINAÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME
MICROBIANO.**

IGOR OLIVEIRA PALAGI DE SOUZA

DR. ALEXANDRE MENEGHELLO FUENTEFRIA

ORIENTADOR

Porto Alegre, 10 de junho de 2013.

Este artigo de revisão foi elaborado segundo as normas do “Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial” apresentadas em anexo

Disponível em: http://www.sbpc.org.br/down/jbpml_instrucoes.pdf

Resumo

As publicações sobre biofilme microbiano pouco discutem e comparam as principais técnicas de avaliação desta forma de interação ecológica. Para sua detecção são necessárias técnicas morfológicas, quantitativas e genéticas. Não existindo uma metodologia padrão-ouro, mas sim vantagens e desvantagens que devem ser consideradas de acordo com a finalidade do estudo. O presente trabalho trata-se de uma revisão bibliográfica ilustrativa das técnicas mais utilizadas no cotidiano de microbiologistas e pesquisadores em geral. Foram analisadas as metodologias colorimétricas do Cristal Violeta, da Redução do Sal Tetrazólio, o método quantitativo utilizando corpos de prova, os métodos morfológicos de Microscopia eletrônica de Varredura, Microscopia Confocal a Laser, Microscopia de Força Atômica e os métodos genotípicos de Marcação de rRNA com Fluorescência e o PCR em tempo real. Conclui-se que para a escolha do melhor método é fundamental um planejamento de acordo com a finalidade de cada estudo, determinando quais técnicas satisfazem suas necessidades experimentais.

Palavras-chave: Revisão sobre Biofilme, Análises de biofilme por Microscopia, Técnicas colorimétricas de análise de biofilmes, detecção de biofilme por técnica molecular.

Abstract

Publications about microbiologic biofilm poorly discuss and compare some major technics of evaluation from this form of ecological interaction. For detecting biofilm is necessary morphological techniques and often quantitative genetic, not existing a gold-standard methodology, but advantages and disadvantages to be considered in accordance with the purpose of the study. This paper relate a literature review, illustrating the most used techniques by microbiologists and researchers in general. We analyzed the colorimetric methods such as Crystal Violet, Tetrazolium Salt Reduction, quantitative method using specimen, the morphological methods like Scanning Electron Microscopy, Confocal Laser Microscopy, Atomic Force Microscopy and genotypic methods as rRNA fluorescently labeled and real time PCR. To choose the best method is crucial a planning according to the purpose of each study in order to determine which meets the needs of an experiment.

Keywords: Review of Biofilm, Biofilm analysis by Microscopy, Biofilm Colorimetric assays, techniques of detecting biofilm, molecular analyses of biofilm.

Introdução

O biofilme microbiano corresponde a uma estrutura formada por um conjunto de células planctônicas que se aderem irreversivelmente sobre um substrato formando microcolônias ^(1, 2). Os micro-organismos são embebidos em uma complexa matriz polimérica formada por diversos compostos, dentre eles proteínas, lipídios, sacarídeos e ácidos nucleicos ^(3, 4, 5).

Segundo o “National Institutes of Health” mais de 80% das infecções bacterianas estão envolvidas com a formação de biofilmes, ocasionando infecções crônicas e com baixa resposta imunológica, conseqüentemente elevando o índice de morbidade e os custos de tratamento ⁽⁵⁾. A estrutura polimérica do biofilme potencializa o processo patogênico de diversos micro-organismos, entre eles estão as espécies patogênicas de *Candida* e de *Staphylococcus*, frequentemente envolvidas em infecções a pacientes imunocomprometidos ^(6, 7). Segundo Sardi et al. (2013) ⁽⁸⁾, a levedura na forma de biofilme apresenta maior resistência a antimicrobianos que na forma de células planctônicas e, como consequência aumenta sua patogenicidade ao hospedeiro. Isto porque os biopolímeros garantem a adesão e coesão de células dos micro-organismos, protegendo as formas vivas da dessecação, cátions metálicos oxidação, antibióticos e ação de luz ultravioleta. A matriz tem a capacidade de reter enzimas produzidas pelos micro-organismos o que garante um mecanismo acessório de digestão extracelular ⁽³⁾. Além disso, bactérias que muitas vezes são parte da microflora normal como *S.epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* e Enterobactérias tornam-se oportunistas em pacientes imunossuprimidos, devido a potencialização da patogenicidade pela formação de biofilmes ⁽²²⁾.

Diversos estudos ressaltam também que a contaminação de utensílios médicos como próteses, cateteres, válvulas artificiais e marca-passos por biofilme podem ser a causa de infecções sistêmicas em indivíduos imunodeprimidos ou coalescentes. Cateteres venosos centrais, devido ao longo tempo que são utilizados pelos pacientes, acabam proporcionando condição favorável para a formação de biofilmes. Como consequência, alguns estudos vêm sendo conduzidos

de forma a definir materiais antimicrobianos e substâncias que evitem a formação dessas comunidades adesivas ^(9,10). Implantes também favorecem a formação de biofilmes e muitas vezes sofrem rejeição do paciente devido à contaminação com bactérias ou fungos, que impedem a adequada osseointegração ⁽¹¹⁾.

Ao mesmo tempo, estudos também destacam a importância da contaminação de biofilmes em alimentos ^(2,12,13). Algumas espécies microbianas são capazes de formar biofilmes de alta densidade tanto em baixas quanto em altas temperaturas, mesmo em presença de elevada concentração de cloreto de sódio, o que representa um maior fator de risco para a contaminação de equipamentos em processos industriais de produção de alimentos.

As publicações sobre biofilmes microbianos pouco discutem ou comparam as principais técnicas de avaliação desta forma de interação microbiana. Com esse intuito, este artigo tem como objetivo apresentar técnicas de avaliação morfológica, qualitativa, quantitativa e genética do biofilme microbiano, discutindo as principais vantagens e desvantagens das principais metodologias (Tabela 1), ilustrando e esquematizando os principais protocolos publicados nos últimos 15 anos na literatura científica.

Discussão

Metodologias colorimétricas de detecção de biofilme microbiológico

Redução do sal tetrazólio (XTT)

O princípio do método por redução de XTT está relacionado com a capacidade de células ativas de micro-organismos em metabolizar o sal tetrazólio a compostos coloridos. A técnica é quantitativa e qualitativa, realizada em microplacas, nas quais o inóculo com suspensão de micro-organismos será adicionado. Após o tempo de crescimento do micro-organismo, o biofilme é formado e o líquido presente é eliminado, adicionando-se a solução XTT. A redução dessa substância a um composto colorido laranja indica a presença de biofilme na microplaca sendo esta lida em equipamento de Elisa, como observado na Figura 1.

Este teste visa, portanto, definir a vitalidade e metabolismo do biofilme microbiano (14,15).

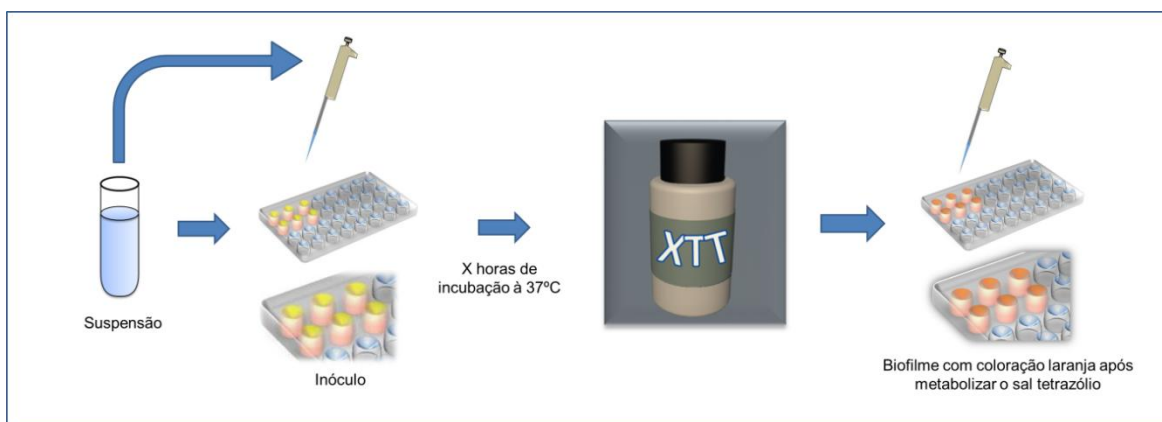


Figura 1. Representação esquemática da metodologia metabolização do XTT a substância Formazan e detecção em ELISA.

Esta técnica tem como vantagem a detecção do biofilme formado por células vivas. Entretanto, como limitações principais aparecem a heterogeneidade de biofilmes que apresentam diversas estruturas de composição e, como consequência metabolismos diferentes. O principal exemplo é o de biofilmes maduros que apresentam lenta redução do XTT e liberação do composto colorido Formazan (16).

Método utilizando corante Cristal Violeta

É um dos métodos mais amplamente utilizados para detecção de biofilmes. Baseia-se na capacidade do cristal violeta penetrar na parede de bactérias Gram positivas ou leveduras e permanecer retido no citoplasma (17, 18).

Como observado na Figura 2, uma suspensão do micro-organismo é realizada e adicionada aos poços de microplacas, sendo as mesmas cobertas e incubadas pelo tempo de crescimento do micro-organismo a 37°C. O conteúdo de cada poço é removido e lavado com água estéril salina. A microplaca é vigorosamente agitada para remover as células não aderidas. O material aderido remanescente é fixado com adição do metanol em cada poço, depois de alguns minutos as placas são esvaziadas e secas ao ar livre. Finalizada essa etapa,

adiciona-se a solução de cristal violeta para a marcação e lavagem em água corrente. Por fim a placa é seca e é adicionado aos poços ácido acético de forma a solubilizar as células aderidas, para posterior medição em um leitor de microplacas de ELISA (18).

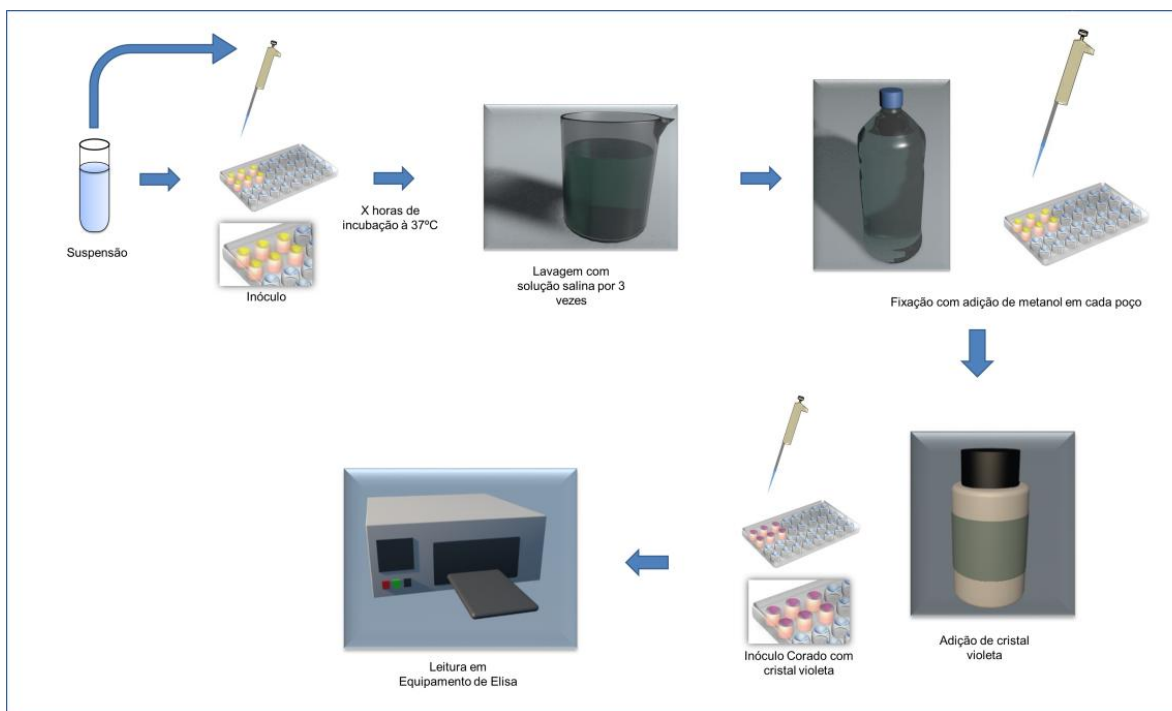


Figura 2. Técnica semi-quantitativa de avaliação do biofilme microbiano (Cristal Violeta).

A técnica do Cristal Violeta apresenta capacidade de quantificação correlacionável a técnica XTT e pode ser usada como técnica complementar as microscopias como forma de quantificar o biofilme já identificado (17).

Esta análise apresenta um espectro pequeno, pois se restringe a microorganismos com parede celular negativamente carregada, como bactérias Gram positivas e fungos leveduriformes e filamentosos. Além disso, a reprodutibilidade é afetada pelas diferenças nas condições de crescimento do biofilme, concentrações dos solventes e tempos de eluição. A técnica do Cristal Violeta não define se a massa de biofilme é de células mortas ou vivas, visto que o cristal violeta é capaz de corar ambas as células (18,19).

Métodos de quantificação do biofilme microbiano

Método fenotípico de escolha para quantificação da carga celular por área aderida em corpos de prova (unidade do material alvo de estudo). A contagem de unidades formadoras de biofilme é realizada após remoção do biofilme por aplicação de ultrassom nos corpos de prova. A carga de células removidas, após diluição decimal seriada é plaqueada em meio de cultura adequado ao tipo de micro-organismo avaliado ^(20,21,22). A técnica tem como limitação o demorado tempo de análise ⁽¹⁹⁾. Um exemplo de metodologia é a utilizada em Enneti et al. (2012) ⁽²³⁾ representada na Figura 3.

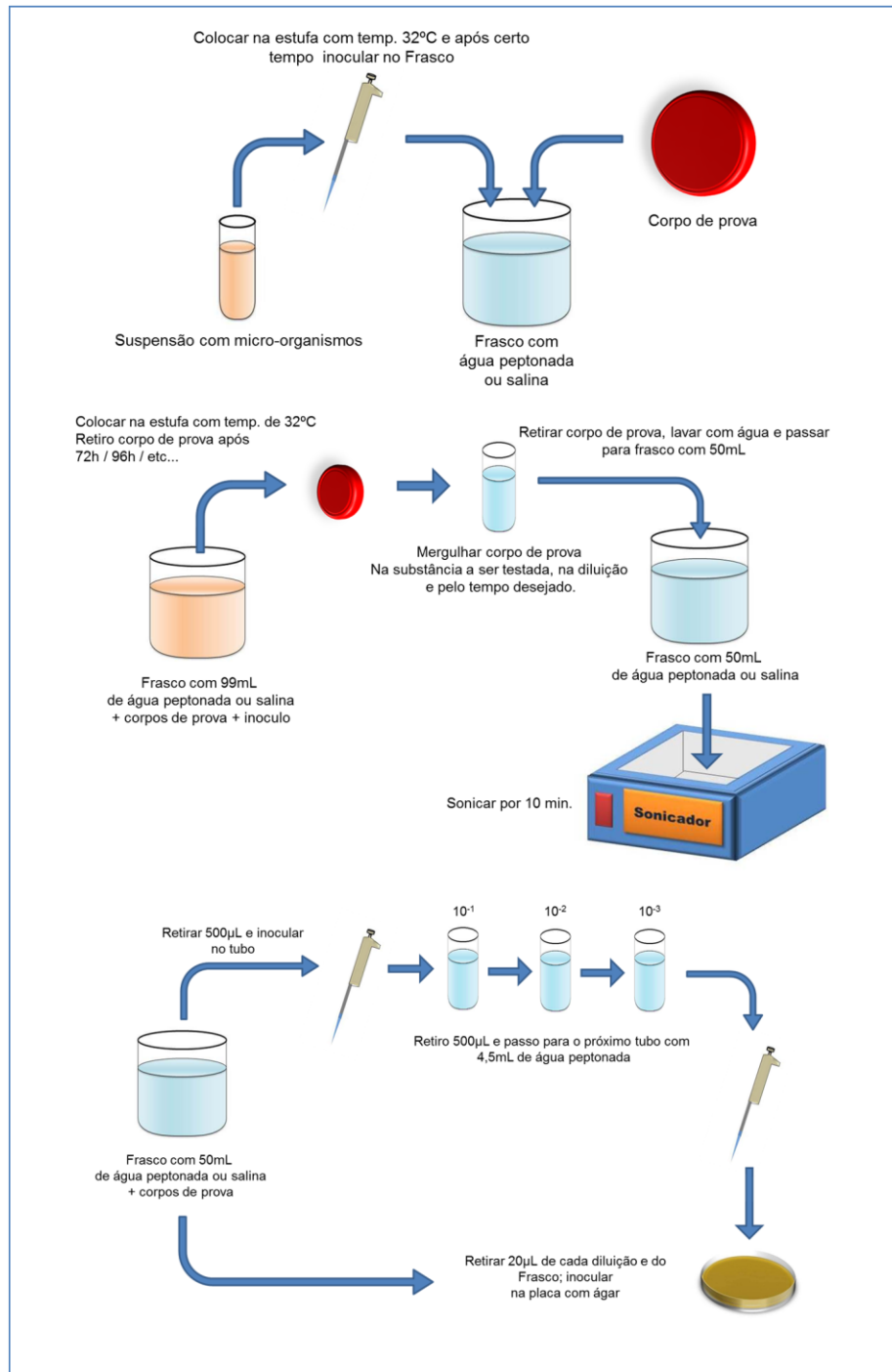


Figura 3. Representação esquemática da metodologia utilizada para determinar a quantidade de biofilme formado utilizando a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC).

Técnicas morfológicas

As microscopias por força atômica, eletrônica e Confocal a Laser são capazes de detectar biofilme sobre superfícies de corpos de prova e também analisar sua conformação.

Microscopia por força atômica (MFA)

A microscopia por força atômica garante uma imagem em três dimensões e medições de amostras biológicas em fluídos e ar. Oferece resoluções a nível nanométrico e dados topográficos da amostra, apresentando modos de operação diversos que garantem diferentes análises, sem a destruição do biofilme microbiológico ⁽²³⁾.

O equipamento é composto de um suporte no qual está fixado uma ponteira com uma sonda metálica, na qual a reflexão do laser incidente é detectada por um fotodiodo, indicando as deflexões observadas (Figura 4). No caso de detecção de biofilmes microbiológicos sobre corpos de provas, as técnicas de interação escolhidas são o modo contato e tapping ^(23,24).

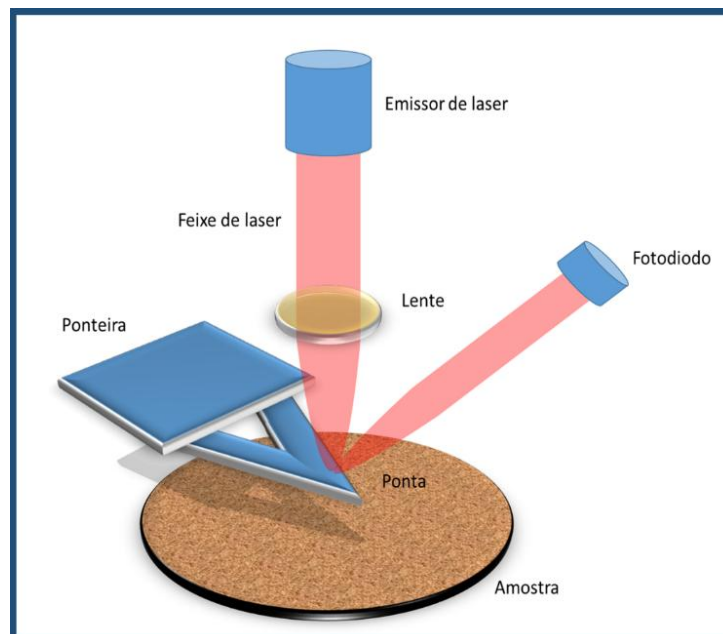


Figura 4. Representação esquemática do microscópio por força atômica (MFA)

Modo por contato (Figura 5): Modo que antecede a análise por tapping. A ponta entra em contato direto com a amostra, analisando somente a superfície do corpo de prova sem a contaminação microbiana ⁽²³⁾.

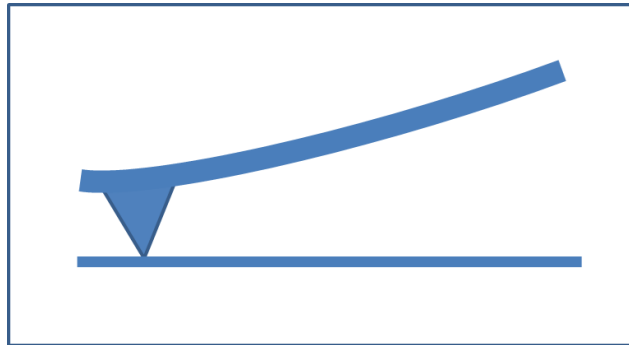


Figura 5. Representação esquemática da ponta do console em contato constante com a amostra a ser analisada (Modo por contato).

Modo Tapping (Figura 6): Modo de avaliação do corpo de prova contaminado. Neste modo a ponta oscila de forma constante tateando delicadamente a amostra, garantindo a preservação do biofilme ⁽²³⁾.

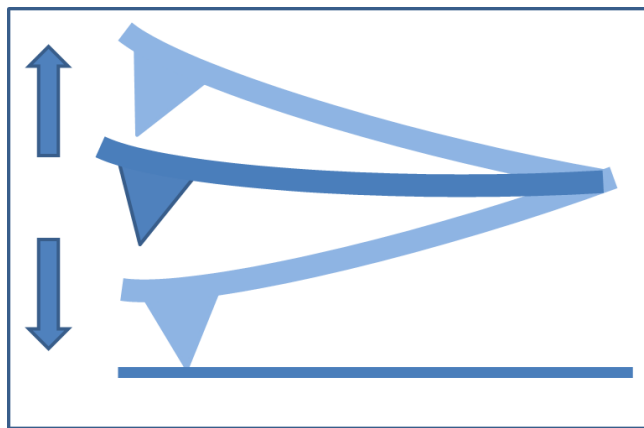


Figura 6. Representação esquemática da ponta do consola em oscilação constante de modo a tatear a amostra (Modo Tapping).

A Microscopia por Força Atômica tem como vantagens frente as outras técnicas de microscopia ser uma técnica livre de utilização de metais, além da capacidade de monitoramento em tempo real da formação dos biofilmes e da estrutura polimérica. É também capaz de mensurar a elasticidade do biofilme, a capacidade de adesão, o volume e interações como forças de Van Der Waals e

eletrostáticas. Entretanto, não é adequada para análises intracelulares, por ser estritamente uma análise da superfície. Também não é adequada para análise de estruturas muito grandes que apresentam uma topografia muito irregular como biofilmes velhos, que apresentam dezenas de microns de relevo na superfície, não encontrados em biofilmes recém formados ^(19,23).

Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Técnica baseada na utilização de um feixe de elétrons de pequeno diâmetro para verificar a superfície de uma amostra. Ponto a ponto, em linhas sucessivas, o sinal é transmitido a uma tela catódica, sendo a varredura sincronizada ao feixe incidente (Figura 7). Quando o feixe de elétrons incide sobre a superfície da amostra, recoberta com uma fina película condutora de ouro ou platina, provoca a emissão de fótons e elétrons que são convertidos em sinal de vídeo. A interação do feixe incidente com a amostra resulta em uma imagem, pois o sinal recolhido regula o brilho do monitor permitindo a observação. A microscopia deve ser realizada em vácuo total ou baixo vácuo, garantindo uma imagem de alta qualidade em duas dimensões ⁽²⁵⁾.

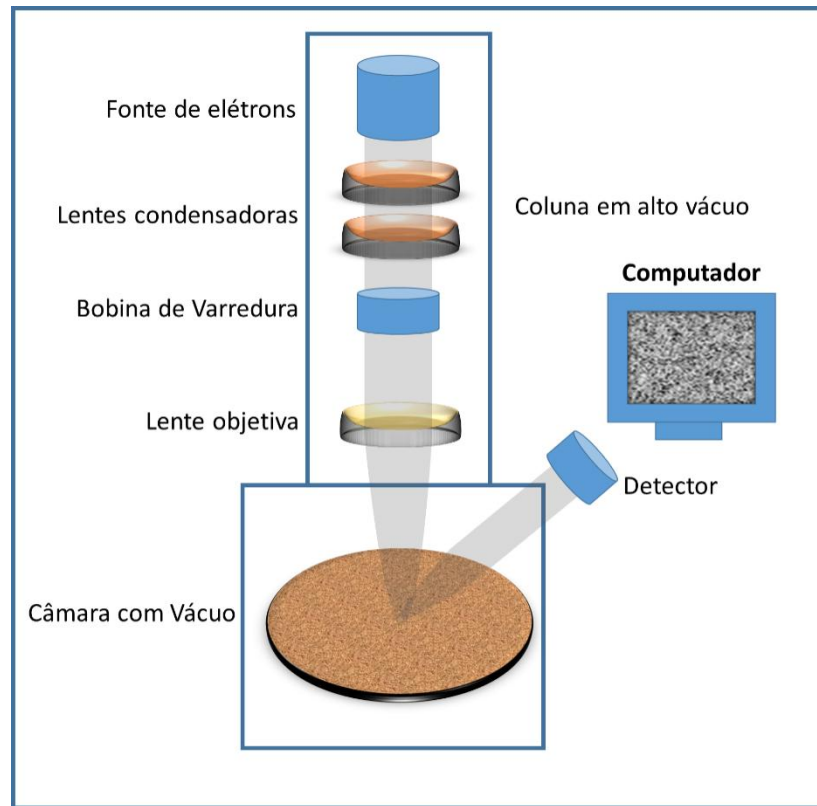


Figura 7: Imagem ilustrativa da Microscopia eletrônica de varredurasobre corpos de prova com biofilme (MEV).

A técnica apresenta como vantagem grande grau de aumento e a alta resolução de imagens. Como principais desvantagens estão a preparação da amostra em ambientes com vácuo, com risco de colapso das estruturas de biofilme; a necessária desidratação da amostra, com risco de alteração da estrutura do biofilme e por fim a necessidade de cobrir a amostra com película de ouro ou platina (19).

Microscopia confocal a laser (MCL)

A microscopia confocal a laser surgiu em meados dos anos 80, sendo desde então aprimorada e utilizada para diversos fins, inclusive na detecção de biofilmes microbiológicos. Seu fundamento é baseado na passagem de um laser por um orifício (pinhole) incidindo sobre um espelho dicróico (reflete somente laser) que projeta o feixe para uma lente objetiva, permitindo que luz atinja um único ponto sobre a amostra. A amostra emite fluorescência para a lente objetiva que

consequentemente emite luz para o espelho dicróico, refletindo-a por diversos filtros, até alcançar um fotomultiplicador que converte o sinal luminoso em dados para um computador. Com os dados digitalizados, pixels são convertidos em imagens tridimensionais, sendo representados assim em dados topográficos ⁽²⁶⁾.

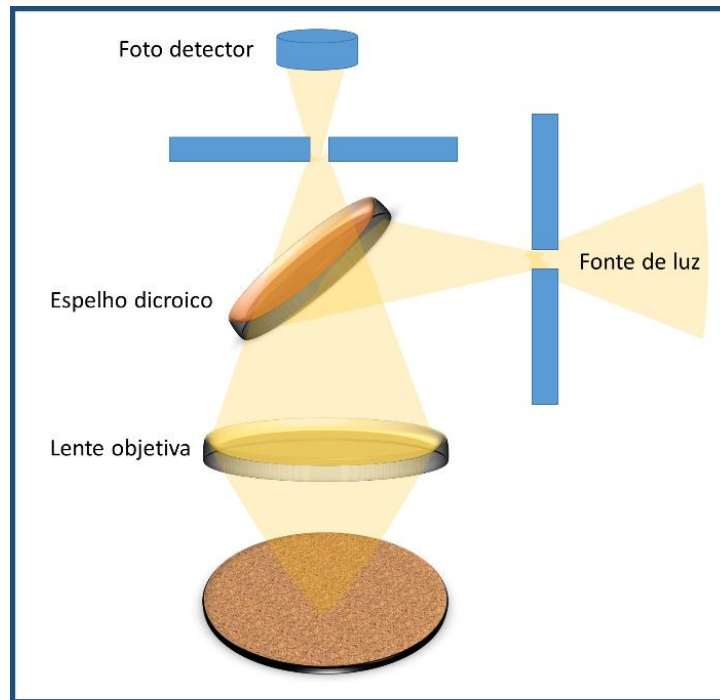


Figura 8: Esquema ilustrativo da Microscopia Confocal a Laser (MCL).

Esta análise apresenta um alto contraste de imagem e resolução, além de apresentar em três dimensões o volume ocupado pelo biofilme. Porém, a metodologia Confocal a Laser tem como limitação apresentar uma análise semi-quantitativa, visto que a quantidade de diferentes fluorescências utilizadas por vez é relativamente baixa, mostrando apenas parte dos componentes do biofilme. Tal limitação pode ser suprida com a utilização de outras técnicas de imagem em conjunto ⁽¹⁹⁾.

Métodos Moleculares de avaliação do biofilme microbiano

PCR em tempo real (qRT-PCR)

Baseia-se na detecção em tempo real da expressão de genes constituintes do biofilme microbiano permitindo a quantificação enquanto ocorre a execução da análise. Esta metodologia está sendo crescentemente utilizada em micro-organismos com primers delineados para os genes constituintes do biofilme, ainda que a amostra esteja contaminada com outros biofilmes. ⁽²⁷⁾ Segundo Xie et al. (2011) ⁽²⁸⁾ a técnica é a melhor alternativa para o método colorimétrico de redução do sal tetrazólio (XTT), visto que esta possui limitações quando utilizada para biofilmes maduros, que apresentam tempo de redução do sal muito lento.

Contudo, como limitação intrinsecamente relacionada às metodologias moleculares, apresenta alto custo, é capaz de detectar biofilme de células não viáveis, necessita de primers específicos, que para a maioria dos micro-organismos produtores de biofilme ainda não foram desenhados ⁽¹⁹⁾.

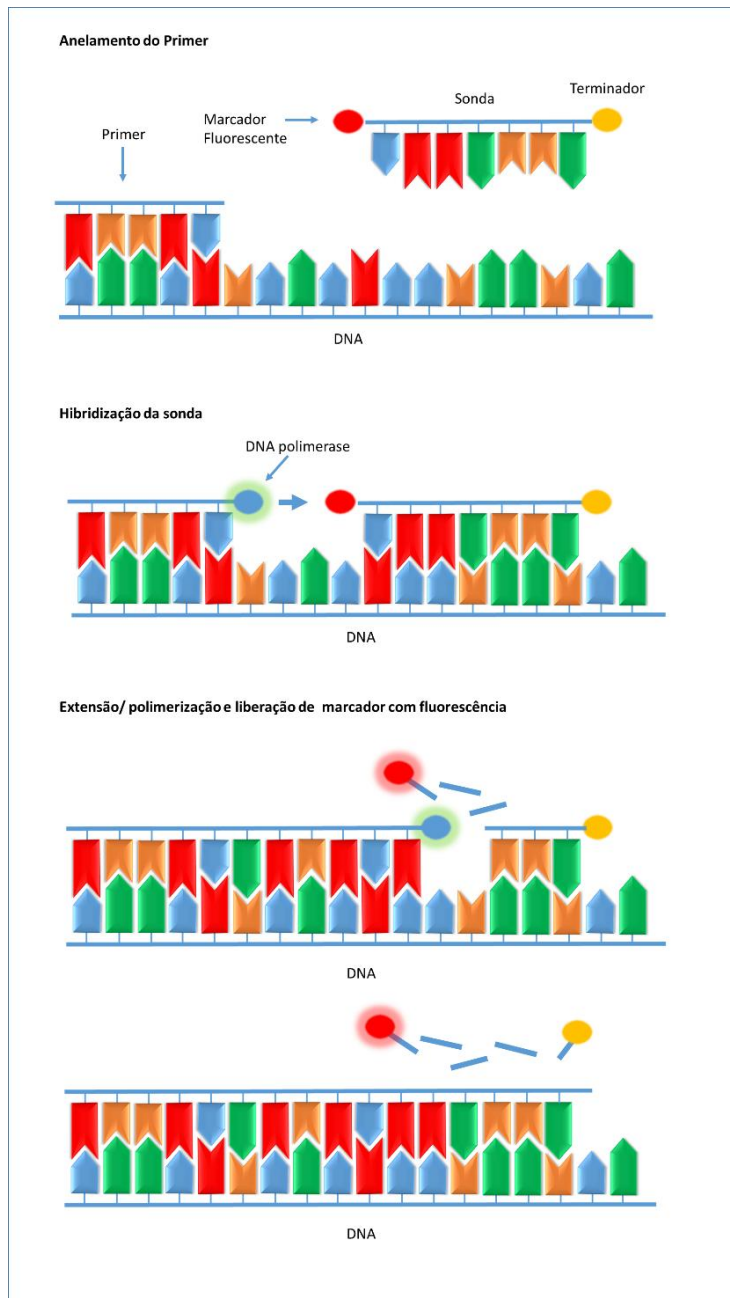


Figura 9. Esquema ilustrativo do qRT-PCR para detecção e quantificação em tempo real da expressão genética do biofilme microbiano.

Marcação de rRNA com fluorescência (FISH)

Fluorescence in situ Hybridization (FISH) caracteriza-se como uma técnica que utiliza sondas marcadas com elementos fluorescentes especificamente delineadas para ligar-se ao rRNA de células de biofilme viáveis do micro-organismo

alvo pesquisado. A técnica permite detecção de células de biofilme de múltiplas espécies diferentes ao mesmo tempo.

Esta técnica acoplada a Microscopia Confocal a Laser garante uma análise topográfica de biofilmes com múltiplas espécies conferindo uma grande vantagem a essa metodologia, como proposto por Thurnheer et al. (2004) ⁽²⁹⁾. Neste estudo foram utilizadas as duas técnicas em conjunto para detecção de bactérias Gram positivas e Gram Negativas em um mesmo biofilme. Entretanto, seu custo operacional é alto e a demanda de tempo é elevada para preparação ⁽¹⁹⁾.

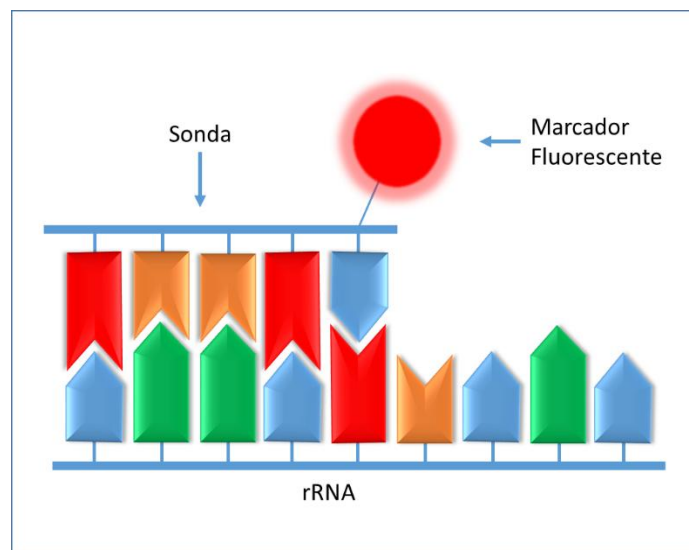


Figura 10. Representação esquemática de um RNA ribossomal ligado a sonda marcada com fluorescência na técnica de Marcação de rRNA com fluorescência (FISH).

Conclusão:

Diferentes técnicas estão disponíveis para detecção de biofilmes, entretanto para a escolha do melhor método, de acordo com a finalidade do estudo, é fundamental definir a técnica de acordo com a sua característica principal, pois não há um padrão-ouro estabelecido capaz de ser sensível, específico e eficaz tanto para biofilmes procarióticos e eucarióticos.

Na tabela 1 é apresentado um grande resumo com os dados coletados de cada técnica sendo portanto as técnicas de microscopias eleitas para análises morfológicas, as colorimétricas para análises semi-quantitativas, a análise por contagem de unidades formadoras de colônia como quantitativa e as análises moleculares como qualitativas e quantitativas. Observando que certas técnicas podem ser utilizadas em conjunto como a de FISH com a microscopia Confocal a Laser para garantir uma análise completa. Contudo, não existe uma única análise capaz de analisar todos os parâmetros ao mesmo tempo.

Neste estudo foi feito um comparativo das principais técnicas de avaliação do biofilme microbiano e ilustrados os principais protocolos de avaliação morfológica, qualitativa, quantitativa e genética, sendo essencial um planejamento do estudo por parte do pesquisador a fim de determinar quais técnicas satisfazem suas necessidades experimentais.

Referências:

1. REMIS, J.P. et al. Biofilms: structures that may facilitate cell–cell Interactions. *The ISME Journal* v.4, n.1, p.1085–1087, 2010.
2. LEE, H.Y. et al. Formation of biofilm by *Listeria monocytogenes* ATCC 19112 at different incubation temperatures and concentrations of sodium chloride. *Braz. J. Microbiol.* 2013.
3. FLEMMING H.C. et al. The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*.v.8, n.1, p.623-633, 2010.

4. MANN, E.E. et al. *Pseudomonas* biofilm matrix composition and niche biology. *FEMS Microbiol. Rev.* v.36, n.4, p.893–916, 2011.
5. RÖMLING, U. et al. Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies. *Journal of Internal Medicine.*v.272, n.6, p.541–561, 2012.
6. MANE A. et al. Biofilm production in oral *Candida* isolates from HIV-positive individuals from Pune, India. *Mycoses*, v.56, n.2, p.182–186, 2013.
7. THOMAS, D. Biofilm formation by plant associated bacteria. *Ann Rev Microbiol.* v.61, n.4, p.01-22, 2007.
8. SARDI, L. et al. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *Journal of Medical Microbiology.*v.62, n.1, p.10–24, 2012.
9. DANESE, P.N. Antibiofilm Approaches: Prevention of Catheter Colonization. *Chem Biol*, v.9, n.8, p. 873-880, 2002.
10. HANDRUP, M.M. et al. Biofilm formation in long-term central venous catheters in children with cancer: a randomized controlled open-labelled trial of taurolidine versus heparin. v.120, n.10, p.794–801, 2012.
11. TILLANDER, J. et al. Osseointegrated Titanium Implants for Limb Prostheses Attachments. *Clin Orthop Relat Res.* v.468, n.10, p.2781–2788, 2010.
12. CLETO, S. et al. Characterization of contaminants from a sanitized milk processing plant. *PLoS ONE*, v. 7, n. 6, e40189, 2012.
13. HYUN, S.Y. et al. Susceptibility of *Listeria monocytogenes* Biofilms and Planktonic Cultures to Hydrogen Peroxide in Food Processing Environments. *Biosci Biotechnol Biochem.*v.76, n.11, p.2008-2013, 2012.
14. KOBAN, I. et al. XTT assay of ex vivo saliva biofilms to test antimicrobial influences. *GMS Krankenhaushygiene Interdisziplinär.*, v.7, n.1, p.1-10, 2012.
15. PIERCE, C.G. et al. A simple and reproducible 96 well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. *Nat Protoc*, v.3, n.9, p.1494–1500, 2008.

16. HONRAET, K. et al. Comparison of three assays for the quantification of *Candida* biomass in suspension and CDC reactor grown biofilms. *J Microbiol Methods*.v.63, n.3, p.287-95, 2005
17. LI, X. et al. Quantitative variation of biofilms among strains in natural populations of *Candida albicans*. *Microbiology*. v.149, n.3, p.53-62, 2003.
18. STEPANOVIC, S. et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS*. v.115, n.8, p.891-899, 2007.
19. PANTANELLA, F. et al. Analytical techniques to study microbial biofilm on abiotic surfaces: pros and cons of the main techniques currently in use. *Ann Ig*.v.25, n.1, p.31-42, 2013.
20. LARA, F.A.F. Microbiota aeróbia e anaeróbia facultativa prevalente no biofilme de disjuntores palatais tipo Haas [monografia]. Curitiba (PR), 2004 - PUC-PR.
21. PIETA, L. Investigação da presença de *Listeria* spp. e *Listeria monocytogenes* em equipamentos e utensílios de indústria de laticínios [monografia]. Porto Alegre (RS), 2010 – Instituto de Tecnologia de Alimentos UFRGS.
22. TAMAYO, R. et al. Growth in a Biofilm Induces a Hyperinfectious Phenotype in *Vibrio cholera*. *Infect Immun*. v.78, n.8, p.3560–3569, 2010.
23. ENNETI, R.K. et al. Critical Issues in Manufacturing Dental Brackets by Powder Injection Molding. *Int J of Powder Metallurgy*.v.48, n.2, p.23-29, 2012.
24. ALONSO, J.L. et al. Feeling the forces: atomic force microscopy in cell biology. *Life Sci*, v.72, n.23, p.2553–2560, 2003.
25. DEDAVID, B.A; GOMES, C.I; MACHADO, G. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA Aplicações e preparação de amostras. 1º ed. Porto Alegre (RS) EdiPUCRS, 2007.
26. PADDOCK, S.W. Principles and Practices of Laser Scanning Confocal Microscopy. *Molecular Biotechnology*. v.16, n.2, p.127-149, 2000.
27. SUZUKI, N. et al. Real-Time TaqMan PCR for Quantifying Oral Bacteria during Biofilm Formation. *Clin Microbiol*, v.42, n.8, p.3827–3830, 2004.

28. XIE, Z. et al. A Quantitative real-time RT-PCR assay for mature *C. albicans* biofilms. BMC Microbiology.v.11, n.1, p.93- 101, 2011.
29. THURNHEER, T. et al. Multiplex FISH analysis of a six-species bacterial biofilm. J Microbiol Methods. v.56, n.1, p.37-47. 2004

Tabela.1

| Métodos Semi-quantitativos | Princípio do método | Vantagens | Limitações |
|--|---|---|---|
| XTT | Metabolização do sal tetrazólio a compostos coloridos. | -Verifica vitalidade e metabolização dos micro-organismos | - Redução do XTT diferente entre micro-organismos deixa teste suscetível a falso resultado. |
| <i>Cristal violeta</i> | Cristal violeta penetra a parede de bactérias Gram positivas e leveduras permanecendo retido no citoplasma. | -Correlacionável a XTT | -Cora somente micro-organismos carregados negativamente, sendo eles vivos e mortos |
| Métodos quantitativos | Princípio do método | Vantagens | Limitações |
| CFU - Contagem de Unidades Formadoras de Colônia. | Contagem de unidades formadoras de colônia. | - Detecção de biofilme sobre corpo de prova | - Falsos negativos, pois ultrassom não garante total remoção do biofilme |

| Métodos morfológicos | Princípio do método | Vantagens | Limitações |
|--|---|---|---|
| <i>Microscopia por Força Atômica</i> | Interação da sonda com a amostra convertida em imagem. | <ul style="list-style-type: none"> - Detecção de biofilme sobre corpo de prova - Livre da utilização de metais - Monitoramento em tempo real da formação de biofilmes e estrutura polimérica - Mensura elasticidade do biofilme, capacidade de adesão, volume e interações como forças de Van Der Waals e eletrostáticas -Análise a nível nano -Análise em três dimensões | <ul style="list-style-type: none"> - Difícil análise de biofilmes muito irregulares (biofilmes maduros) |
| <i>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</i> | Feixe de elétrons incididos sobre a amostra são refletidos na forma de fótons e elétrons e o sinal é convertido em vídeo. | <ul style="list-style-type: none"> - Detecção de biofilme sobre corpo de prova -Alta resolução de imagens | <ul style="list-style-type: none"> - Preparação da amostra Necessária devido a análise ser em câmara à vácuo |

| <i>Microscopia Confocal a Laser</i> | Laser que incide sobre a amostra e é refletido na forma de fluorescência detectada e convertida em imagem. | <ul style="list-style-type: none"> - Detecção de biofilme sobre corpo de prova - Alto contraste de imagem e alta resolução - Análise em três dimensões | -Impossível realizar análise em tempo real |
|-------------------------------------|---|---|---|
| Métodos Moleculares | Princípio do método | Vantagens | Limitações |
| qRT-PCR | Multiplicação de ácidos nucleicos e detecção de genes específicos de micro-organismos em uma amostra sendo esta quantidade proporcional ao biofilme formado | -Detecta e quantifica biofilmes específicos, mesmo quando contaminados com outros micro-organismos | <ul style="list-style-type: none"> -Falsos positivos -Alto custo -Difícil execução, sujeita a contaminação - Os primers devem ser específicos e alguns micro-organismos não foram caracterizados - Capaz de detectar biofilmes formados por células mortas |

| | | | |
|---|--|--|---|
| <p><i>Marcação de rRNA com fluorescência (FISH)</i></p> | <p>Sondas marcadas com elementos fluorescentes especificamente criadas para ligar-se ao rRNA, de determinado micro-organismo</p> | <ul style="list-style-type: none"> -Detecção de um biofilme com múltiplas espécies diferentes ao mesmo tempo - Utilização em conjunto com Microscopia Confocal a Laser permite análise topográfica | <ul style="list-style-type: none"> -Técnica cara, -Demanda tempo -É complexa para preparação |
|---|--|--|---|