

Sonicação como uma ferramenta para romper biofilmes e recuperar microrganismos em cateteres vesicais

Sonication as a tool for disrupting biofilms and recovering microorganisms in bladder catheters

Autores

Juliette Cieslinski¹ 
 Victoria StadlerTasca Ribeiro¹ 
 Camila Kowodzeichak de Lima¹ 
 Letícia Kraft¹ 
 Paula Hansen Suss¹ 
 Felipe Francisco Tuon¹ 

¹Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Escola de Medicina, Laboratório de Doenças Infecciosas Emergentes, Curitiba, PR, Brasil.

Data de submissão: 29/08/2022.
 Data de aprovação: 09/03/2023.
 Publicado em: 08/05/2023.

Correspondência para:
 Victoria StadlerTasca Ribeiro.
 E-mail: vicstadler@gmail.com

DOI: <https://doi.org/10.1590/2175-8239-JBN-2022-0129pt>

RESUMO

Introdução: A infecção relacionada ao cateter urinário é comumente associada ao biofilme bacteriano. O impacto dos anaeróbios é desconhecido, mas sua detecção no biofilme deste dispositivo não foi relatada anteriormente. Este estudo teve como objetivo avaliar a capacidade de recuperar microrganismos estritos, facultativos e aeróbios em pacientes que utilizam cateteres vesicais de UTIs utilizando cultura convencional, sonicação, análise urinária e espectrometria de massa. **Métodos:** Paralelamente, foram comparados cateteres vesicais sonicados de 29 pacientes gravemente enfermos com sua urocultura de rotina. A identificação foi realizada utilizando dessorção/ionização a laser assistida por matriz com espectrometria de massa por tempo de voo. **Resultados:** A taxa de positividade na urina (n = 2; 3,4%) foi inferior à dos cateteres sonicados (n = 7; 13,8%). **Conclusão:** A sonicação do cateter vesical apresentou resultados de cultura mais positivos do que as amostras de urina para microrganismos anaeróbios e aeróbios. É discutido o papel dos anaeróbios na infecção do trato urinário e no biofilme do cateter.

Descritores: Cateter vesical; Microrganismos; Urinário; Biofilme; Sonicação.

INTRODUÇÃO

O uso de cateter urinário é um fator de risco importante para o desenvolvimento de infecções do trato urinário devido à biocarga relacionada ao tempo. Quando um cateter urinário de longa permanência é inserido, ele se torna colonizado por microrganismos que podem se fixar ao dispositivo médico, formando colônias que podem ser encerradas em uma matriz polimérica conhecida como biofilme^{1,2}.

ABSTRACT

Introduction: Urinary catheter-related infection is commonly associated with bacterial biofilm. The impact of anaerobes is unknown, but their detection in the biofilm on this device has not been previously reported. This study aimed to evaluate the capability to recovery strict, facultative, and aerobic microorganisms in patients using bladder catheters from ICUs using conventional culture, sonication, urinary analysis, and mass spectrometry. **Methods:** Parallel, sonicated bladder catheters from 29 critically ill patients were compared with their routine urine culture. Identification was performed using matrix-assisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry. **Results:** The positivity rate in urine (n = 2, 3.4%) was lower than that in sonicated catheters (n = 7, 13.8%). **Conclusion:** Bladder catheter sonication showed more positive culture results than urine samples for anaerobic and aerobic microorganisms. The role of anaerobes in urinary tract infection and catheter biofilm is discussed.

Keywords: Bladder catheter; Microorganisms; Urinary; Biofilm; Sonication.

O biofilme pode conter espécies únicas ou múltiplas; os organismos envolvidos podem ser fungos e bactérias anaeróbias e/ou aeróbias, e muitos destes biofilmes podem induzir graves complicações^{3,4}.

Diversos métodos têm sido utilizados para identificar a população bacteriana embutida em um biofilme. A avaliação microbiológica do biofilme pode ser feita por técnicas qualitativas, quantitativas e semi-quantitativas⁵. Para análise quantitativa, a coloração de violeta de

genciana pode ser utilizada, mas ela não avalia a presença de células bacterianas vivas, apenas a matriz extracelular do biofilme. Com esta coloração, é possível avaliar a presença ou ausência de um biofilme e quantificá-lo por espectrofotometria após a remoção do biofilme por sonicção⁶. A técnica de rolamento em placa, semelhante à cultura de ponta do cateter venoso, também pode ser utilizada, sendo considerada uma técnica semi-quantitativa, onde a ponta da sonda é deslizada sobre uma placa de cultura e, em seguida, as células podem ser contadas. Técnicas que removem o biofilme, como sonicção ou vórtex, podem ser usadas para quantificação, sendo a sonicção um método mais apropriado, uma vez que apresenta uma melhor capacidade de remoção do biofilme⁷. A sonicção é um método utilizado para avaliar infecções associadas a dispositivos médicos invasivos, pois permite a remoção do biofilme associado a microrganismos⁸. As bactérias anaeróbicas (*Bifidobacterium* spp., *Bacteroides* spp., *Veillonella* spp., *Eubacterium* spp., *Anaerococcus* spp., *Prevotella* spp.) podem ser identificadas em 25% das amostras urinárias de pacientes em unidades de terapia intensiva (UTIs). No entanto, o papel desses microrganismos na iniciação e perpetuação da infecção do trato urinário neste contexto ainda não está claro⁹.

Infelizmente, a maioria dos estudos sobre a prevalência de anaeróbios na urina de pacientes críticos com cateter urinário estão desatualizados e utilizam métodos não padronizados de identificação,

tais como a dessorção/ionização a laser assistida por matriz com espectrometria de massa por tempo de voo (MALDI-TOF MS, por sua sigla em inglês), que é o padrão ouro atual para identificação bacteriana. Além disso, estes estudos examinaram apenas a urina, não a presença do microrganismo no biofilme do cateter urinário.

Considerando estes aspectos e a escassa literatura sobre microrganismos associados ao trato urinário e ao biofilme do cateter vesical, avaliamos a capacidade de recuperar microrganismos estritos, facultativos e aeróbicos em cateteres vesicais de pacientes na UTI usando cultura convencional, sonicção, análise urinária e espectrometria de massa.

MÉTODOS

Este foi um estudo retrospectivo com amostras de urina e cateter vesical de 29 pacientes internados nas UTIs do Hospital Universitário Cajuru (Curitiba, Paraná, Brasil) entre agosto e setembro de 2018. Após a recuperação, a urina foi depositada em uma placa de ágar anaeróbio (Anaerinsol-S ágar, Probac do Brasil, São Paulo, Brasil) para o cultivo de microrganismos anaeróbios estritos e em uma placa de ágar sangue (Laborclin – A Solabia Group, Pinhais, Brasil) para o cultivo de microrganismos anaeróbios e aeróbios facultativos (para 72 e 48 h a 36°C, respectivamente). Para a sonicção, os cateteres foram colocados em um tubo cônico estéril de 50 ml. Em seguida, o tubo foi submerso em solução de Ringer com Lactato e agitado

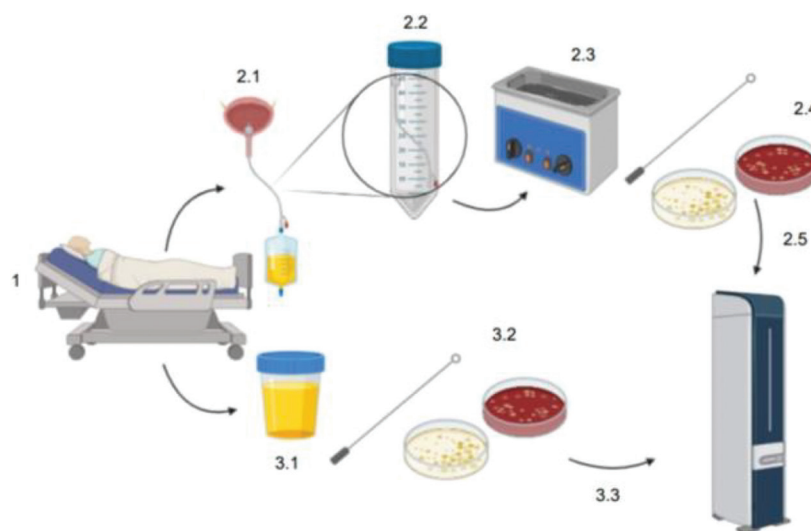


Figura 1. Recuperação de amostras (urina e cateter vesical) de 29 pacientes. 1: Paciente em UTI foi selecionado. 2.1: Recuperação do cateter vesical. 2.2: Preparação do cateter vesical. 2.3: Sonicção. 2.4: Cultivo de fluidos sonicados. 2.5: Após incubação, colônias isoladas foram identificadas por MALDI-TOF. 3.1: Recuperação de urina. 3.2: A urina foi imediatamente submetida à cultura microbiana. 3.3: Após incubação, colônias isoladas foram identificadas por MALDI-TOF. Amostras de ambos os grupos foram cultivadas com o objetivo de isolar microrganismos aeróbicos e anaeróbicos.

em vórtex por 30 segundos, seguido de sonicção em banho ultrassônico (Sanders, Minas Gerais, Brasil) a 40 kHz a 37°C por 5 minutos e novamente agitado em vórtex por 30 segundos¹⁰. Após este procedimento, o líquido sonicado foi cultivado em Anaerinsol-S e ágar sangue para quantificação (como descrito acima). A Figura 1 ilustra o fluxo de recuperação de amostras. Este estudo avaliou a prevalência destes microrganismos, mas não a associação com infecção confirmada do trato urinário. A identificação foi realizada utilizando MALDI-TOF MS (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Alemanha). As variáveis contínuas são relatadas como média com desvio padrão (\pm DP) ou mediana e intervalo interquartil, enquanto as variáveis categóricas são relatadas como frequências ou porcentagens.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Vinte e nove pacientes foram incluídos neste estudo, sendo dez mulheres (34,5%) e 19 homens (65,5%). Nosso estudo encontrou uma taxa de positividade menor na urina do que nos cateteres para microrganismos anaeróbicos estritos. Apenas 3,4% das amostras de urina apresentaram crescimento anaeróbico, enquanto 13,8% das amostras de cateter foram positivas para microrganismos anaeróbicos estritos em cultura. Para microrganismos anaeróbicos e aeróbicos facultativos, apenas 41,4% das amostras de urina apresentaram crescimento aeróbico, enquanto 72,4% das amostras de cateter foram positivas em cultura.

O MALDI-TOF foi capaz de identificar dois microrganismos anaeróbicos em amostras de urina e sete em amostras de cateter vesical sonicado, bem como 13 microrganismos aeróbicos em amostras de urina e 25 em amostras de cateter vesical sonicado (Tabela 1). A concordância de positividade entre as amostras foi de 100% com ambos os métodos. Entretanto, a taxa de positividade foi maior em amostras de cateter do que em amostras de urina. Apenas a urina e o cateter de um paciente testaram positivo em cultura anaeróbica (Tabela 2).

Nossos resultados mostraram uma taxa de positividade mais elevada em amostras de cateter do que em amostras de urina tanto para microrganismos anaeróbicos quanto aeróbicos, enquanto outro estudo relatou uma taxa muito menor de positividade em urina do que em cateteres usando cultura¹¹. O padrão ouro para o diagnóstico de infecções do trato

urinário associadas a cateter é a cultura quantitativa; entretanto, uroculturas de rotina não suportam o crescimento de bactérias anaeróbicas¹². A presença de anaeróbios na urina foi descrita, embora raramente em associação com infecções. Em 15.250 espécimes de urina, menos de 2% eram anaeróbios e nenhum estava associado a infecção. O anaeróbio mais comum foi o *Lactobacillus*, seguido por *Clostridium*, *Bacteroides*, *Peptostreptococcus*, e *Peptococcus*. Estes microrganismos são comumente encontrados em microbiota regional (vaginal e intestinal), sugerindo a possibilidade de contaminação dos sítios¹³.

O primeiro estudo a identificar anaeróbios em pacientes com cateteres uretrais de longa permanência foi publicado em 1976. Em um estudo com 13 pacientes com cateteres de longa permanência, anaeróbios (*Bifidobacterium* sp, *Clostridium* sp, e *Veillonella* sp) foram detectados na urina obtida por aspiração percutânea suprapúbica com agulha para evitar contaminação⁶. Foram detectadas bactérias anaeróbicas $> 10^3$ por mL de urina em $> 5\%$ das amostras obtidas de aspirados suprapúbicos da bexiga, incluindo espécies de *Peptostreptococcus*, *Veillonella*, *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Clostridium*, e *Bifidobacterium*¹⁴. No entanto, 15% dos anaeróbios identificados nas amostras de urina estavam revestidos de anticorpos, sugerindo um papel potencial na infecção urinária¹⁵.

Este estudo apresentou várias limitações, incluindo o fato de ter apenas 29 pacientes. Examinamos somente pacientes com cateteres que estavam internados na UTI e conhecidos por estarem em risco de bacteriúria e infecções do trato urinário. Dessa forma, os resultados não podem ser generalizados para outras populações. A real patogenicidade destes microrganismos não foi avaliada, mas a maior positividade das culturas sonicadas sugere que estes microrganismos estão associados ao biofilme. O biofilme é definido como uma comunidade de microrganismos aderidos a uma superfície e envolvidos por uma matriz extracelular autoproduzida. Descobriu-se que *Fingoldia magna* e *Prevotella* sp. aderem fortemente a superfícies abióticas e se desenvolvem como biofilmes¹⁶. *Peptostreptococcus anaerobius* também tem sido associado à formação de biofilmes orais¹⁷; entretanto, ainda não há clareza sobre os biofilmes formados por microrganismos anaeróbicos. Microrganismos anaeróbicos colonizam temporariamente o trato

TABELA 1 MICRORGANISMOS (AERÓBICOS E ANAERÓBICOS) NA URINA E NO CATETER VESICAL IDENTIFICADOS POR MALDITOF

Amostra	Tipo	Micro-organismo	n (%)
Urina	Aeróbico (n = 12)	<i>Aspergillus fumigatus</i>	1 (8,3%)
		<i>Candida glabrata</i>	1 (8,3%)
		<i>Enterobacter cloacae</i>	1 (8,3%)
		<i>Enterococcus faecalis</i>	1 (8,3%)
		<i>Enterococcus faecium</i>	1 (8,3%)
		<i>Escherichia coli</i>	2 (16,7%)
		<i>Morganella morganii</i>	1 (8,3%)
		<i>Proteus mirabilis</i>	1 (8,3%)
		<i>Pseudomonas extremorientalis</i>	1 (8,3%)
		<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1 (8,3%)
		<i>Staphylococcus capitis</i>	1 (8,3%)
		Anaeróbico (n = 2)	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>
<i>Fingoldia magna</i>	1 (50,0%)		
Cateter vesical	Aeróbico (n = 25)	<i>Candida albicans</i>	1 (4,0%)
		<i>Candida glabrata</i>	1 (4,0%)
		<i>Corynebacterium striatum</i>	1 (4,0%)
		<i>Enterococcus faecium</i>	1 (4,0%)
		<i>Enterococcus faecalis</i>	1 (4,0%)
		<i>Enterobacter cloacae</i>	1 (4,0%)
		<i>Enterococcus faecalis</i>	6 (24,0%)
		<i>Escherichia coli</i>	4 (16,0%)
		<i>Morganella morganii</i>	1 (4,0%)
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2 (8,0%)
		<i>Proteus mirabilis</i>	1 (4,0%)
		Polimicrobial flora	1 (4,0%)
		<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2 (8,0%)
		<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	1 (4,0%)
		<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	2 (8,0%)
Anaeróbico (n = 7)	<i>Peptoniphilus harei</i>	1 (14,3%)	
	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	1 (14,3%)	
	<i>Petoniphilus assaccharolyticus</i>	1 (14,3%)	
	<i>Prevotella bivia</i>	2 (28,6%)	
		<i>Prevotella disiens</i>	2 (28,6%)

urinário, sugerindo um papel potencial na infecção urinária.

A sonicção do cateter vesical mostrou resultados de cultura mais positivos do que as amostras de urina para microrganismos anaeróbicos e aeróbicos. Sabe-se que o uso de um cateter urinário pode aumentar o risco de desenvolvimento de bacteriúria em 3 a 7% para cateterização diária¹⁸. Além disso, microrganismos anaeróbicos estritos podem ocorrer no cateter vesical, e a sonicção pode ser uma maneira

alternativa de desalojar e recuperar microrganismos do material, uma vez que pode separar biofilme e microrganismos da superfície. Os resultados encontrados em nosso estudo corroboram dados anteriores e indicam que a bacteriúria anaeróbica é comum em pacientes de UTI com cateteres¹². A significância clínica deste estudo está relacionada à presença de anaeróbios em biofilmes, sugerindo que estes patógenos podem estar associados à infecção e à formação do biofilme.

TABELA 2 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE LEUCOCITOSE EM AMOSTRAS DE URINA E CATETER VESICAL COM CRESCIMENTO AERÓBICO E ANAERÓBICO

ID do paciente	Sexo	Leucócitos na urina	Aeróbicos na urina CFU/mL	Aeróbicos na urina MALDI TOF	Anaeróbicos na urina CFU/mL	Anaeróbicos na urina MALDI TOF	Aeróbicos no cateter vesical CFU/mL	Aeróbicos no cateter vesical MALDI TOF	Anaeróbicos no cateter vesical CFU/mL	Anaeróbicos no cateter vesical MALDI TOF
1	Masculino	Não analisado	>100.000	<i>Escherichia coli</i>	>100.000	<i>Peptostreptococcus anaerobius/</i> <i>Finnegoldia magna</i>	10.000	<i>Escherichia coli</i>	>100.000	<i>Petoniphilus assaccharolyticus</i>
2	Masculino	3.000	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	520	<i>Corynebacterium striatum</i>	>100.000	<i>Prevotella disiens/</i> <i>Peptostreptococcus anaerobius/</i> <i>Prevotella bivia</i>
3	Masculino	>1.000.000	>100.000	<i>Enterobacter cloacae</i>	Negativo	Negativo	>100.000	<i>Enterobacter cloacae</i>	>100.000	<i>Prevotella disiens/</i> <i>Peptoniphilus harei</i>
24	Feminino	>1.000.000	>100.000	<i>Proteus mirabilis</i>	Negativo	Negativo	>100.000	<i>Proteus mirabilis</i>	>100.000	<i>Prevotella bivia</i>

CONCLUSÃO

Estudos adicionais são necessários para compreender a patogenicidade e os mecanismos das bactérias anaeróbicas e seu papel nas infecções de pacientes com cateteres. Também colocamos a hipótese de que esses anaeróbios possam contribuir para a formação de biofilme, aumentando a complexidade da comunidade bacteriana como um ambiente simbiótico para microrganismos patogênicos. Este estudo destaca a necessidade de confirmar a importância das bactérias anaeróbicas no desenvolvimento e manutenção do biofilme e a necessidade de tratamento ou não dessas infecções.

AGRADECIMENTOS

Gostaríamos de agradecer à Fundação Araucária e Associação Paranaense de Cultura (APC) (CP 10/2019).

CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

JC concepção, desenho e condução dos experimentos. VSTR concepção e desenho do estudo, redação do manuscrito, condução dos experimentos. CKL condução dos experimentos. LK concepção e desenho do estudo, análise e interpretação dos dados. PHS análise e interpretação dos dados, redação do manuscrito. FFT concepção e desenho do estudo, análise e interpretação dos dados.

CONFLITO DE INTERESSE

FFT é pesquisador do CNPq. Os outros autores declararam não haver interesses conflitantes.

REFERÊNCIAS

- Denstedt JD, Wollin TA, Reid G. Biomaterials used in urology: current issues of biocompatibility, infection, and encrustation. *J Endourol.* 1998;12(6):493–500. doi: <http://dx.doi.org/10.1089/end.1998.12.493>. PubMed PMID: 9895250.
- Thomas-White K, Brady M, Wolfe AJ, Mueller ER. The bladder is not sterile: history and current discoveries on the urinary microbiome. *Curr Bladder Dysfunct Rep.* 2016;11(1):18–24. doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s11884-016-0345-8>. PubMed PMID: 27182288.
- Saint S, Chenoweth CE. Biofilms and catheter-associated urinary tract infections. *Infect Dis Clin North Am.* 2003;17(2):411–32. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0891-5520\(03\)00011-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0891-5520(03)00011-4). PubMed PMID: 12848477.
- Macleod SM, Stickler DJ. Species interactions in mixed-community crystalline biofilms on urinary catheters. *J Med Microbiol.* 2007;56(11):1549–57. doi: <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.47395-0>. PubMed PMID: 17965358.
- Corvec S, Portillo ME, Pasticci BM, Borens O, Trampuz A. Epidemiology and new developments in the diagnosis of prosthetic joint infection. *Int J Artif Organs.* 2012;35(10):923–34. doi: <http://dx.doi.org/10.5301/ijao.5000168>. PubMed PMID: 23138706.
- Chaibeen V, Yamada CH, Telles JP, Andrade AP, Arend LNV, Ribeiro VST, et al. A carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* outbreak associated with a polymyxin shortage during the COVID pandemic: an in vitro and biofilm analysis of synergy between meropenem, gentamicin and sulbactam. *J Antimicrob Chemother.* 2022;77(6):1676–84. doi: <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkac102>. PubMed PMID: 35368079.
- Bjerkkan G, Witso E, Bergh K. Sonication is superior to scraping for retrieval of bacteria in biofilm on titanium and steel surfaces in vitro. *Acta Orthop.* 2009;80(2):245–50. doi: <http://dx.doi.org/10.3109/17453670902947457>. PubMed PMID: 19404811.
- Slobbe L, El Barzouhi A, Boersma E, Rijnders BJ. Comparison of the roll plate method to the sonication method to diagnose catheter colonization and bacteremia in patients with long-term tunneled catheters: a randomized prospective study. *J Clin Microbiol.* 2009;47(4):885–8. doi: <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00998-08>. PubMed PMID: 19171682.
- Sapico FL, Wideman PA, Finnegold SM. Aerobic and anaerobic flora in bladder urine of patients with indwelling urethral catheters. *Urology.* 1976;7(4):382–4. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0090-4295\(76\)90251-X](http://dx.doi.org/10.1016/0090-4295(76)90251-X). PubMed PMID: 178084.

10. Trampuz A, Piper KE, Jacobson MJ, Hanssen AD, Unni KK, Osmon DR, et al. Sonication of removed hip and knee prostheses for diagnosis of infection. *N Engl J Med*. 2007;357(7):654–63. doi: <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa061588>. PubMed PMID: 17699815.
11. Xu Y, Moser C, Al-Soud WA, Sørensen S, Høiby N, Nielsen PH, et al. Culture-dependent and -independent investigations of microbial diversity on urinary catheters. *J Clin Microbiol*. 2012;50(12):3901–8. doi: <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01237-12>. PubMed PMID: 23015674.
12. Rozenfeld KL, Nitzan O, Peretz A. Presence of anaerobic bacteria in the urinary tract of catheterized ICU patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2018;37(11):2131–6. doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s10096-018-3349-9>. PubMed PMID: 30121803.
13. Headington JT, Beyerlein B. Anaerobic bacteria in routine urine culture. *J Clin Pathol*. 1966;19(6):573–6. doi: <http://dx.doi.org/10.1136/jcp.19.6.573>. PubMed PMID: 4288917.
14. Dankert J, Mensink WF, Aarnoudse JG, Meijer-Severs GJ, Huisjes HJ. The prevalence of anaerobic bacteria in suprapubic bladder aspirates obtained from pregnant women. *Zentralbl Bakteriolog Orig A*. 1979;244(2-3):260–7. PubMed PMID: 388942.
15. Meijer-Severs GJ, Aarnoudse JG, Mensink WF, Dankert J. The presence of antibody-coated anaerobic bacteria in asymptomatic bacteriuria during pregnancy. *J Infect Dis*. 1979;140(5):653–8. doi: <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/140.5.653>. PubMed PMID: 118996.
16. Donelli G, Vuotto C, Cardines R, Mastrantonio P. Biofilm-growing intestinal anaerobic bacteria. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2012;65(2):318–25. doi: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-695X.2012.00962.x>. PubMed PMID: 22444687.
17. Souza MGM, Leandro LF, Moraes TDS, Abrão F, Veneziani RCS, Ambrosio SR, et al. ent-Copallic acid antibacterial and anti-biofilm properties against *Actinomyces naeslundii* and *Peptostreptococcus anaerobius*. *Anaerobe*. 2018;52:43–9. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2018.05.013>. PubMed PMID: 29885640.
18. Al-Hameed FM, Ahmed GR, AlSaedi AA, Bhutta MJ, Al-Hameed FF, AlShamrani MM. Applying preventive measures leading to significant reduction of catheter-associated urinary tract infections in adult intensive care unit. *Saudi Med J*. 2018;39(1):97–102. doi: <http://dx.doi.org/10.15537/smj.2018.1.20999>. PubMed PMID: 29332116.