

# Eficácia de curativo não medicamentoso sobre bactérias isoladas e nas encapsuladas em biofilme: evidência laboratorial e clínica

---

**Mark G. Rippon**,<sup>1</sup> PhD, Visiting Clinical Research Fellow; **\*Alan A. Rogers**,<sup>2</sup> Medical Communications Consultant; **Laura Sellars**,<sup>3</sup> PhD, Senior Microbiologist; **Kathryn M. Styles**,<sup>3</sup> PhD, Senior Microbiologist; **Samantha Westgate**,<sup>3</sup> PhD, CEO

\*Corresponding author email: alan@woundcaresol.co.uk

**1** Huddersfield University, Queensgate, Huddersfield. **2** Flintshire, North Wales.  
**3** Perfectus Biomed Limited, Daresbury Laboratories, SciTech Daresbury, Cheshire.



# Eficácia de curativo não medicamentoso sobre bactérias isoladas e nas encapsuladas em biofilme: evidência laboratorial e clínica

**Objetivo:** O objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade de curativo não medicamentoso, (HRWD) *hydro-responsive wound dressing* para efetivamente ajudar na remoção de bactérias conhecidas por residir (e causar infecções) no ambiente da ferida.

**Método:** Uma série de estudos *in vitro* foram realizados usando biofilmes de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* para avaliar as capacidades do HRWD para romper e dispersar os biofilmes.

**Resultados:** Biofilmes podem ser rompidos e dispersos por HRWD e tanto na quantidade de *Staphylococcus aureus* quanto de *Pseudomonas aeruginosa* pode ser reduzida por um fator maior que log2 na presença de HRWD. Entretanto, nenhum agente “ativo” que tenha um efeito antimicrobiano foi liberado no ambiente da ferida.

**Conclusão:** No geral, esses estudos mostraram que esse curativo atua como uma ferramenta eficaz para desbridamento, e há outros mecanismos “físicos” antimicrobianos que afetam a presença bacteriana.

Estes mecanismos incluem 1) ruptura e dispersão de biofilmes de modo que as bactérias planctônicas resultantes são absorvidas pelo curativo e 2) sequestradas e retidas no interior de sua matriz. Além disso, quando o PHMB (polihexametileno de biguanida) está presente dentro do núcleo do curativo, mas não é liberado no ambiente da ferida há um efeito antimicrobiano adicional resultante de 3) contato físico com este componente antisséptico que reduz ainda mais a patogenicidade da bactéria além de 4) absorver e sequestrar as proteases prejudiciais liberadas pela bactéria patogênica. **Declaração de interesse:** Este estudo foi apoiado por Paul Hartmann Ltd.

**Curativos hidro-responsivos • investigações laboratoriais • ação antimicrobiana mecânica • *Pseudomonas aeruginosa* • *Staphylococcus aureus***

**E**studos realizados no final dos anos 1970 mostraram que bactérias estão presentes nas feridas não apenas como organismos de vida livre (planctônicos), mas podem estar associadas, em formações que agregam muitos microrganismos denominadas biofilmes.<sup>1</sup> No passado,

considerava-se as infecções crônicas como o resultado da ação de bactérias patogênicas planctônicas<sup>2</sup> mas outros estudos sugeriram que os biofilmes são importantes componentes na gênese das infecções crônicas,<sup>3</sup> as evidências de que os biofilmes são onipresentes em feridas crônicas. São cada vez mais presentes<sup>2,4,5</sup> Devido à sua natureza microscópica biofilmes são difíceis de identificar na prática clínica,<sup>6</sup> mas, no entanto, há maior compreensão da importância dessas comunidades de bactérias na biologia de feridas.<sup>7</sup>

Nas feridas crônicas, os biofilmes são compostos por comunidades de bactérias multe espécies que são residentes dentro de substâncias (EPS) extracelulares, poliméricas, autoproduzidas.<sup>8,9</sup> A presença de bactérias na ferida e particularmente daquelas nos biofilmes, podem contribuir significativamente para causar a cronicidade da ferida,<sup>2,10-12</sup> e, portanto, há indicação clara para controlar e reduzir a presença de biofilmes no leito da ferida.

A presença de um biofilme no leito da ferida é uma barreira para a evolução fisiológica da cicatrização das feridas,<sup>6</sup> e a natureza física do biofilme limita a capacidade do curativo para interagir melhor com o tecido do leito da ferida. Eles são resistentes a remoção física, e as bactérias do biofilme mostram uma maior resistência às defesas dos hospedeiros e a agentes tópicos antimicrobianos em comparação com as bactérias planctônicas.

<sup>13-16</sup> A maior resistência dos biofilmes a agentes antimicrobianos, como aos antibióticos, é um problema particular, pois bactérias em biofilmes tem mostrado ser 100- 1000 vezes mais resistentes a agentes antimicrobianos do que as espécies equivalentes de bactérias planctônicas.<sup>17,18</sup> Há uma preocupação crescente com relação à resistência antimicrobiana,<sup>19</sup> e um recente documento da *European Wound Management Association* (EWMA) documento sobre o uso de antimicrobianos em feridas que não cicatrizam adequadamente, destaca a importância do uso cuidadoso dos agentes antimicrobianos.<sup>20</sup> O uso de regimes de tratamento antimicrobiano para feridas que não cicatrizam tem sido questionado,<sup>20</sup> e há grande preocupação com o potencial desenvolvimento de resistência em relação a maioria dos agentes antimicrobianos. As estruturas do Biofilme não contribuem diretamente para a resistência genotípica de microrganismos, no entanto, quando isolados e outros organismos resistentes residem em um biofilme eles são protegidos fisicamente pelo EPS, sua redução de sua taxa metabólica que diminui sua capacidade de metabolizar antimicrobianos e seus resistência genotípica fornece resistência a antibióticos específicos,

**Mark G. Rippon,<sup>1</sup> PhD, Visiting Clinical Research Fellow; \*Alan A. Rogers,<sup>2</sup> Medical Communications Consultant; Laura Sellars,<sup>3</sup> PhD, Senior Microbiologist; Kathryn M. Styles,<sup>3</sup> PhD, Senior Microbiologist; Samantha Westgate,<sup>3</sup> PhD, CEO \*Corresponding author email: alan@woundcaresol.co.uk**  
**1** Huddersfield University, Queensgate, Huddersfield. **2** Flintshire, North Wales.  
**3** Perfectus Biomed Limited, Daresbury Laboratories, SciTech Daresbury, Cheshire.

consequentemente há proteção tripla contra antibióticos de primeira linha estão disponíveis para serem revestidos pelo biofilme organismos resistentes. Formas alternativas de controlar e reduzir níveis elevados de microrganismos (incluindo biofilmes) precisam ser considerados.

Se os biofilmes se formam na superfície das feridas, é importante entender e avaliar como os curativos na ferida interagem com essas comunidades bacterianas. Modelos *in vitro* têm sido usados para avaliar a capacidade dos curativos para feridas em afetar os biofilmes,<sup>21-23</sup> quando aplicados estes produtos para tratamento de feridas na superfície dos biofilmes crescidos sobre diferentes superfícies incluindo: modelo de superfície inerte;<sup>24-26</sup> estruturas tridimensionais, como matrizes de colágeno;<sup>27</sup> pele equivalente.<sup>28</sup> e explantes de pele.<sup>29</sup>

Foi relatado que os biofilmes podem estabelecer dentro do tecido, incluindo abaixo da superfície do leito da ferida<sup>2</sup> O desenvolvimento de biofilmes em estruturas tridimensionais semelhantes a tecido permite uma melhor reprodução de uma situação *in vitro* em termos de vestir interações biofilme-superfície dos tecidos. O presente estudo investigou a eficácia de um curativo hidro responsivo (HRWD) contra bactérias do estado planctônico e na prevenção do desenvolvimento de biofilme maduro, tolerante de dois bem estudados patógenos de feridas, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

## Métodos

Curativos testados

Curativos para feridas e ferramentas de desbridamento testados:

- ● HRWD (HydroClean)
- ● HRWD com polihexametileno biguanida (PHMB, HydroClean plus)
- ● Curativo de espuma de hidrofibra (Aquacel, HFD)
- ● Curativo de espuma de hidrofibra com prata e antibiofilme tecnologia (Aquacel Ag + Extra, HFD com prata e tecnologia antibiofilme)
- ● Curativo de gaze viscosa não aderente (gaze NA). Ambos os curativos de gaze HFD e NA foram usados como controles. O HFD com prata e antibiofilme a tecnologia foi usada como um controle positivo. HRWD é um curativo absorvente contendo matriz hidro-responsiva ; Poliacrilato superabsorvente "pré-ativado" partículas contendo solução de Ringer.
- 

## Cepas bacterianas e condições de cultura

*Pseudomonas aeruginosa* (DSM 15442 e NCIMB 10434) e *Staphylococcus aureus* (DSM 20231 e NCTC 8325) foram mantidas como culturas de estoque em tubos criogênicos a  $-70^{\circ}\text{C}$  para armazenamento de longo prazo.

## Método de formação de biofilme: Método 1: método de placa de múltiplos poços

As bactérias foram cultivadas a  $32^{\circ}\text{C}$  em um caldo Lysogeny de 5ml (LB) -Mídia sob agitação (150rpm) até as culturas atingiram a fase estacionária. Uma cultura foi então diluída 1: 100 com crescimento de Caldo de Soja Triptico (TSB) estéril fresco meio a cultura (suplementado com glicose a 0,25%). Aliquotas de cultura diluída foram adicionados a cada um dos 24 ou 96 poços em uma placa de micro

titulação fresca, sem cultura de tecidos. Placas foram cobertas e incubadas a  $32^{\circ}\text{C}$  por 48-72 horas sem agitação em uma incubadora estática sob condições úmidas. Após este tempo, os poços foram enxaguados 3x com solução salina estéril.

## Biofilm formation method 2: porcine skin explant method

As culturas (24 horas) foram colhidas de Triptona Soja placas de ágar (TSA) e ressuspensas em TSB para atingir uma concentração de  $1 \times 10^8$  unidades formadoras de colônia (CFU) / ml suspensão. Este foi então diluído para aproximadamente  $1 \times 10^3$  CFU / ml. Porções de explantes de pele de suínos (2cm x 4cm) irradiados com radiação gama foram inoculados com Inoculum de bactéria de 100  $\mu\text{l}$ , que foi espalhado uniformemente sobre a superfície do explante. Explantes de pele inoculada foram incubados a  $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$  por quatro horas antes do a superfície ser lavada 3x com solução salina estéril.

## Método 3: Modelo de reator The Center for Disease de Control

Esse modelo do Centro de Controle de Doenças (CDC) incorpora superfícies de crescimento de biofilme removíveis, permitindo a formação de biofilme sob condições dinâmicas de cisalhamento moderado a alto e tem sido usado para detectar formação de biofilme, sua estrutura é avaliar a atividade de agentes antimicrobianos sobre o biofilme.<sup>30,31</sup> O reator CDC sistema tem se mostrado uma ferramenta experimental confiável para o cultivo de biofilmes para estudos experimentais.<sup>32</sup> Após 24 horas as culturas são colhidas a partir de placas de ágar *Tryptone Soy* (TSA) e ressuspensas em TSB para uma concentração de  $1 \times 10^7$  CFU / ml. Inóculo bacteriano (400 $\mu\text{l}$ ) foi usado para inocular um reator de biofilme CDC contendo policarbonato cupons usando um método padrão credenciado pela UKAS. O reator CDC inoculado foi então incubado por 24 horas a  $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$  e  $50 \pm 5$  rpm. Após a incubação, biofilmes foram removidos do reator e lavados 3x com solução salina estéril antes do tratamento.

## Método de ensaio: Método de ensaio 1: avaliação da atividade antibacteriana planctônica

Curativos testados (HRWD + curativo de PHMB e HFD) foram seccionados sob condições assépticas em segmentos de 2 cm x 4 cm. Esses segmentos foram ativados com a adição de 1ml de TSB. Um inóculo bacteriano de  $1 \times 10^6$  CFU / ml (100 $\mu\text{l}$ ) foi preparado e aplicado diretamente nas amostras de curativos. Os controles negativos tinham 100  $\mu\text{l}$  de TSB estéril aplicado. Todas as amostras de curativo foram fechadas em placas de Petri e incubado a  $37^{\circ}\text{C}$ . Após 24 horas e 30 minutos, os curativos foram retirados e colocados em 10ml de solução salina e sonificado por cinco minutos para romper as bactérias aderidas. As células viáveis foram então contadas para medir as CFUs.

## Método de ensaio 2: método de placa de múltiplos poços

As amostras foram preparadas em condições assépticas. Um volume de soluções de teste de 0,15 ml ou os segmentos foram adicionados a cada poço contendo biofilme de 24 horas. Todas as placas foram incubadas a  $32^{\circ}\text{C}$  pelo período definido (um, dois e três dias) sem agitação. Para estudar o efeito dos materiais sobre o biofilme, as amostras foram removidas suavemente dos poços por pipetagem e substituídas por 0,2 ml de solução neutralizadora.

Após 15 minutos, a solução neutralizante foi removida e os poços foram enxaguados duas vezes com 0,2 ml solução salina estéril. Meio de crescimento fresco e as placas foram incubadas a 32 ° C. O crescimento foi monitorado por mudanças em densidade óptica (medida a 595 nm).

### Método de ensaio 3: método de explante de pele suína

As amostras de curativo foram preparadas em condições assépticas e divididas em tamanhos de 3cm x 5cm. Amostras de curativo foram colocados em amostras de explante de pele suína contendo quatro biofilmes de 1 hora e incubados a 37 ± 2 ° C por 24 horas. Após o tratamento, os curativos foram retirados e um curativo de 2cm x amostra de 2 cm de cada curativo foi avaliada usando um Kits de viabilidade de biofilme FilmTracer LIVE / DEAD (ThermoFisher Scientific) para diferenciar organismos viáveis dos não viáveis. Os explantes de pele suína tratada foram lavados 3x com solução salina estéril antes de serem colocados em 20ml de solução salina tamponada com fosfato (PBS) e sonicada por 5 minutos para recuperar organismos viáveis do amostras de pele tratadas. A suspensão resultante foi diluída em série e enumerado em placas de TSA.

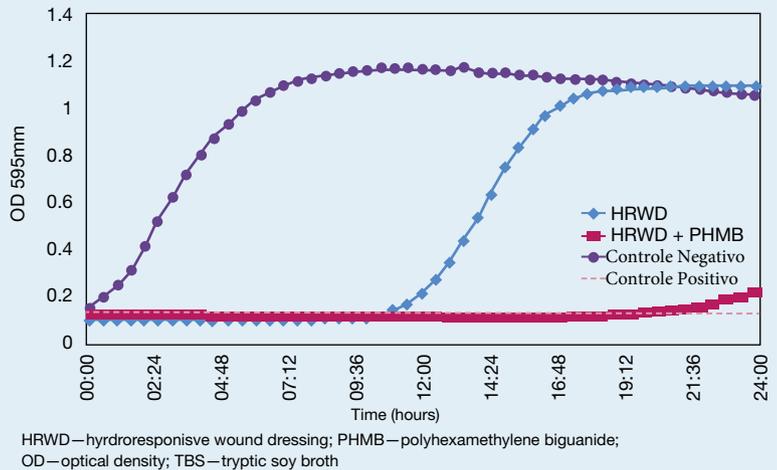
### Método de ensaio 4: Modelo de reator Center of Disease Control

Os biofilmes formados nos cupons de policarbonato foram impressados entre mini curativos intactos (HRWD + PHMB) ou em seções de 2 cm x 2 cm de HFD com prata e tecnologia antibiofilme (controle positivo) ou 2cm x 2cm seções de HFDs. Amostras de controle negativo (PBS + 25% TSB) foram colocadas em PBS + 25% TSB e incubados em 37 ± 2 ° C por 72 horas. Todos os curativos foram 'ativados' com PBS + 25% TSB antes da aplicação ao cupom. Após 72 horas de incubação, foi removido um cupom por condição. O material viável restante foi recuperado usando sonicção e quantificado usando diluições em série e contagem de placas. Todas as amostras foram banhadas em triplicado. Todos os cupons restantes, tiveram os curativos removidos e substituídos por novos, curativos ativados de modo similar uma troca de curativo na situação clínica. Cupons de controle eram transferidos para uma amostra fresca de PBS + 25% TSB. Amostras foram então incubadas a 37 ± 2 ° C por mais 72 horas. Foi repetido até que quatro aplicações de curativo fossem concluídas (13 dias).

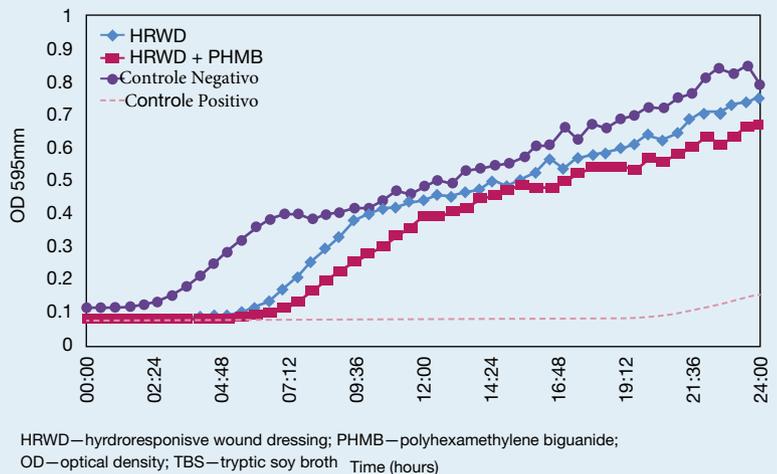
### Determinação da viabilidade de bactérias usando fluorescência e microscopia confocal de varredura a laser

A viabilidade de biofilmes expostos a curativos e seus componentes foi avaliada usando o FilmTracer LIVE / DEAD Biofilm Viabilidade Kits de acordo com as instruções do fabricante. As amostras coradas eram visualizadas usando um microscópio confocal Olympus FLUOVIEW FV10i I usando excitação apropriada / conjuntos de filtros de emissão. O ensaio de viabilidade é um ensaio bicolor de fluorescência para avaliar a viabilidade bacteriana (com base em integridade da membrana) que distingue bactérias vivas das mortas usando as diferenças na capacidade de os dois corantes fluorescentes para penetrar bactérias saudáveis, cor verde fluorescente, enquanto as bactérias com danos membranas (isto é, mortas) coram de vermelho fluorescente.

**Fig 1.** Avaliação do biofilme de *Staphylococcus aureus* por 24 horas (placa de micro titulação método) interrompido por HRWD (± PHMB). O controle negativo: incubação com TSB meio sozinho. O controle positivo: incubação com peróxido de hidrogênio a 6%.



**Fig 2.** Avaliação do biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* 24 horas (placa de micro titulação método) interrupção por HRWD (± PHMB). O controle negativo: incubação com Meio TSB sozinho. O controle positivo: incubação com peróxido de hidrogênio a 6%.



### Análise Estatística

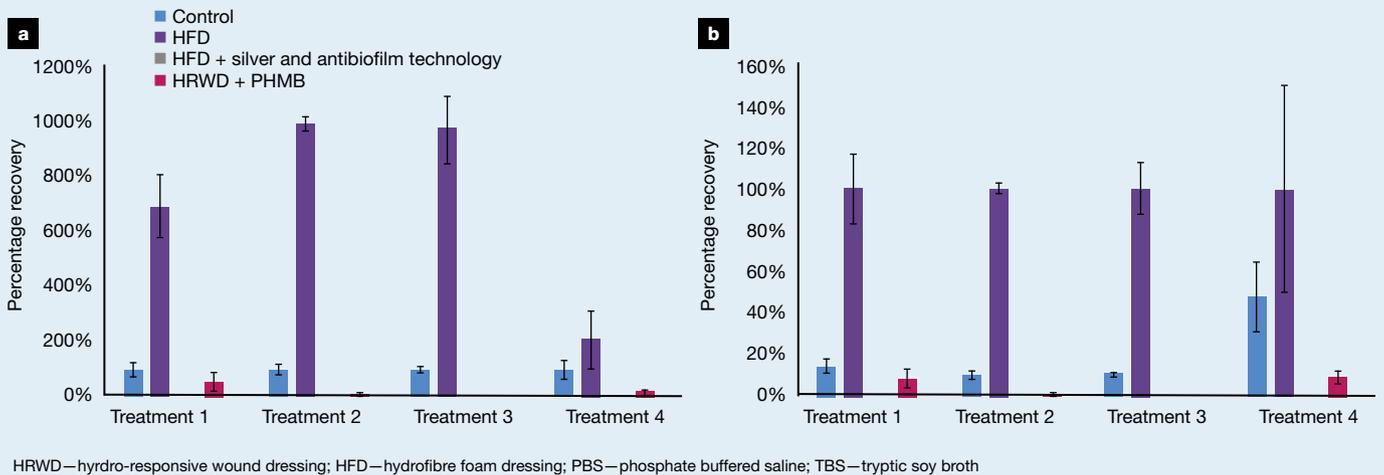
Os dados foram expressos, quando apropriado, pelo desvio padrão médio dos dados em triplicado. Teste de T de Student foi usado para calcular os valores significativos: redução da carga bacteriana foi expressa como a porcentagem de redução em resposta a atividade não-antimicrobiana.

### Resultados

#### Dispersão de biofilme

Um modelo de biofilme de placa de múltiplos poços in vitro (método de formação de Biofilme 1) Avaliar a ação do HRWD na dispersão de biofilme (método de ensaio 2).

**Fig 3.** Recuperação de *Staphylococcus aureus* viável (%) do cupom do reator do Center for Disease Control após aplicações repetidas dos Curativos HRWD + PHMB, HFD, HFD + prata e tecnologia antibiofilme (controle positivo) ou PBS + 25% TSB (controle negativo). Os valores para PBS + 25% de controle de TBS (a) e HFD representam 100% de recuperação (b)



**Tabela 1.** Recuperação de *Staphylococcus aureus* viável de cupons tratado com HRWD + PHMB em comparação com PBS + 25% TSB (controle)

	Tratamento 1	Tratamento 2	Tratamento 3	Tratamento 4
	Average±SD	Average±SD	Average±SD	Average±SD
HRWD + PHMB	58.2±29.0%	29.0±2.2	1.9±0.1%	19.0±6.2%
p-value	NS	p<0.01	p<0.001	p<0.05

SD—standard deviation; HRWD—hydro-responsive wound dressing; PHMB—polyhexamethylene biguanide; TBS—tryptic soy broth

**Tabela 2.** Recuperação de *Staphylococcus aureus* viável de cupons tratados com HRWD + PHMB em comparação com HFDs

	Tratamento 1	Tratamento 2	Tratamento 3	Tratamento 4
	Average±SD	Average±SD	Average±SD	Average±SD
HRWD + PHMB	8.4±4.2%	1.1±0.2%	0.2±0.0%	9.0±3.0%
P-value	p<0.01	p<0.001	p<0.001	p<0.05

SD—standard deviation; HRWD—hydro-responsive wound dressing; HFD—hydrofibre foam dressing; PHMB—polyhexamethylene biguanide; TBS—tryptic soy broth

**Tabela 3.** Recuperação de *Staphylococcus aureus* a partir de 30 minutos e Incubação de 24 horas com HRWD + PHMB e HFDs

	HRWD+PHMB	HFD	Resumo
30 minutos	4.86 log <sub>10</sub> CFU/ml	3.75 log <sub>10</sub> CFU/ml	Aumento de 1,11 log recuperado de HRWD+PHMB comparado com Hydrofibre foam
24 horas	3.09 log <sub>10</sub> CFU/ml	8.88 log <sub>10</sub> CFU/ml	Diminuição de 5,79 log recuperado de HRWD+PHMB comparado com Hydrofibre foam
Mudança nos microorganismos recuperados	-1.77 log	+5.13 log	

HRWD—hydro-responsive wound dressing; PHMB—polyhexamethylene biguanide; HFD—hydrofibre foam dressing; CFU—colony forming units; hydrofibre foam dressings

Os dados mostram que os biofilmes (estabelecidos para entre 48 e 72 horas) são rompidos e dispersos por HRWD. Incubação de biofilmes por 24 horas com produtos não medicamentosos HRWD (ou seja, HRWD sem PHMB ligado) resultou em uma diminuição no número de bactérias viáveis de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* biofilmes comparados com controles (Fig. 1 e 2). A adição de PHMB irreversivelmente ligado ao HRWD (HRWD + PHMB) resultou na ação de um agente antimicrobiano adicional (Fig. 1 e 2). Estes Biofilmes *Staphylococcus aureus* de *Pseudomonas aeruginosa* supõe-se terem sido interrompidos pelo HRWD, liberando bactérias planctônicas (flutuação livre) que poderiam então serem retidas pelo curativo. Esses dados foram confirmados usando um método de reator de biofilme do CDC modificado para produzir biofilmes de 24 horas (método de formação de biofilme 3). Foi projetado para avaliar a ação de dispersão de biofilme de aplicação repetida de HRWD + PHMB (ensaio método 4). Após incubação com HRWD + PHMB, houve uma redução significativa no número de *Staphylococcus aureus* recuperável e viável em comparação com o PBS + 25% de controle de TSB (Fig. 3a e Tabela 1), com a menor porcentagem de recuperação em comparação com o controle sido observada após três trocas de curativo quando apenas 1,9% das bactérias foram recuperadas do amostras de controle negativo foram obtidas após o tratamento com HRWD + PHMB. Quando comparado os dados com o HFD (Fig. 3b e Tabela 2), todas as quatro aplicações de HRWD + PHMB mostraram uma redução significativa na recuperação de *Staphylococcus aureus*, com todas as aplicações de curativos resultando em <10% recuperação de microrganismos viáveis em comparação com HFD. Nenhum organismo viável foi recuperado de cupons tratados com o curativo de controle positivo (HFD com prata e tecnologia antibiofilme) após qualquer das aplicações.

## Curativo intacto

A fim de avaliar a absorção e retenção de bactérias seriam liberados de biofilmes rompidos, investigamos (método de ensaio 1) a capacidade do HRWD para reter suspensões de microrganismos quando aplicado a amostras de curativos. Observamos que a incubação de HRWD+ PHMB com *Staphylococcus aureus* por 24 horas levou a um sequestro das bactérias dentro do curativo e essa captura de as bactérias inibiu o crescimento bacteriano dentro do curativo. Após o tratamento com HRWD + PHMB, houve uma redução de 1,77 log no número de bactérias recuperadas após 24 horas de incubação em comparação com os níveis de *Staphylococcus aureus* recuperados após 30 minutos. Para comprar um aumento de 5,13 log foi observado nos números de *Staphylococcus aureus* recuperados após 24 horas (em comparação com 30 minutos) após tratamento com o curativo de espuma de hidro fibra (Tabela 3 e Fig 4). Coletivamente, isso sugere que, ao contrário do Controle HFD, curativo HRWD + PHMB não promove a proliferação bacteriana e, portanto, reduz bactérias recuperáveis viáveis dentro do curativo.

## Sequestro dentro do material do núcleo

A contribuição do polímero superabsorvente (SAP) núcleo de HRWDs para o sequestro e aprisionamento de microrganismos foi avaliada pela aplicação de suspensões de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* no núcleo interno HRWD (método de ensaio 1). Depois de uma Incubação de 24 horas de *Staphylococcus aureus* dentro do núcleo interno do HWRD, houve uma redução no número de microrganismos viáveis recuperados de HRWD + PHMB em comparação com o curativo de controle (Fig 5). A quantidade de *Staphylococcus aureus* viável recuperado de HRWD + PHMB também foi menor do que isso recuperado de HRWD. Esses estudos de sequestro estender as descobertas anteriores que HRWDs ligam e retêm microrganismos em testes in vitro, reduzindo o número de organismos viáveis.<sup>33</sup> Imagens de microscopia eletrônica demonstraram que os microrganismos foram aderidos para a superfície e absorvido pelo núcleo de curativo SAP. Não houve diferença na quantidade de microrganismos recuperados de HRWD e o controle curativo (Fig. 5). Resultados semelhantes foram observados quando HRWDs foram desafiados com *Pseudomonas aeruginosa*.

## Morte por contato

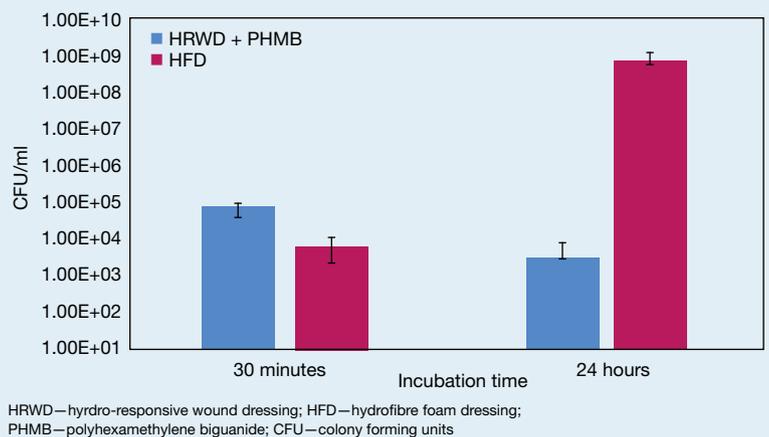
Usando microscopia confocal de fluorescência a laser (CLSM), foi avaliada a captação de *Staphylococcus aureus* pela HRWD. Os resultados mostraram um nível significativo de absorção de bactérias em todos os curativos testados e morte bacteriana de *Staphylococcus aureus* presos dentro o HRWD, bem como HRWD + PHMB (Fig 6). Curativos foram aplicados por 24 horas em explantes de pele suína previamente inoculado com *Staphylococcus aureus* para produzir um biofilme na superfície do explante de pele (método de formação de biofilme 2 e método de ensaio 4). Após o tratamento dos biofilmes com os curativos, uma avaliação da viabilidade de *Staphylococcus aureus* absorvido pelos curativos com ensaio de viabilidade, visualizado usando CLSM. HRWD e HRWD +

PHMB mostrou níveis significativos de glóbulos vermelhos inviáveis (Fig. 6c e 6d), indicando que os microrganismos presentes em ambos os curativos foram inviáveis. Amostras de HFD continham principalmente bactérias viáveis coradas com coloração fluorescente verde (Fig 6a) com poucos glóbulos vermelhos não viáveis (mortos), ou seja, ocorreu, pequena destruição bacteriana.

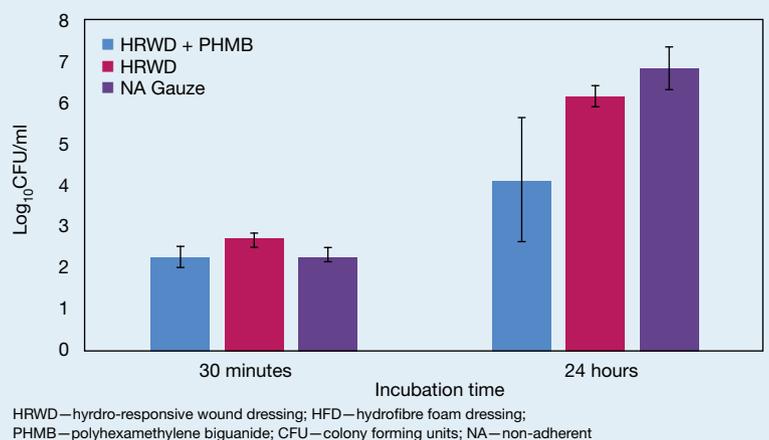
## Sem liberação de PHMB antimicrobiano

Curativos de teste incubados em cima do material de biofilme em superfície de explantes de pele suína foram removidos após 24 horas, a quantidade de microrganismos recuperáveis restante na superfície do explante foi medida. Não houve diferença significativa na quantidade de organismos viáveis recuperados após o tratamento com HRWD, HRWD + PHMB e um HFD não medicamentoso (Fig 7). Houve, no entanto, uma redução no número de *Staphylococcus aureus* recuperáveis de biofilmes tratados com HFD com tecnologia de prata e antibiofilme indicando que os ingredientes ativos contidos nesta substância eram liberados do curativo.

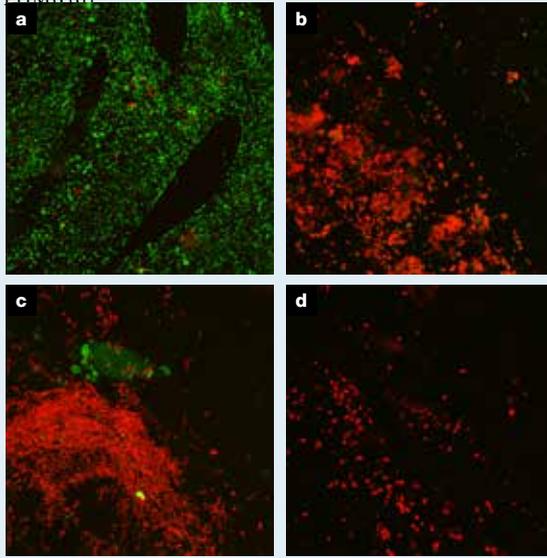
**Fig 4.** Recuperação de *Staphylococcus aureus* viável quando inoculado em Amostras de curativo HRWD + PHMB por 30 minutos e 24 horas



**Fig 5.** Avaliação do crescimento de *Staphylococcus aureus* quando inoculado em núcleo interno por 30 minutos e 24 horas



**Fig 6.** . Imagens de microscopia confocal de varredura a laser de amostras de curativos contendo cores vivas (verde) e *Staphylococcus aureus* morto (vermelho), espuma de hidrofibra curativo (HFD) (a); HFD com prata e antibiofilme tecnologia (controle positivo) (b); hidro-responsivo curativo para feridas (HRWD) (c); e HRWD + PHMB (d)



**Discussão**

Bactérias dentro de biofilmes mostram maior resistência a agentes antimicrobianos, e isso permite que essas bactérias mantenham sua viabilidade apesar da exposição prolongada do antimicrobiano.<sup>20</sup> A ruptura do biofilme reverte essa tolerância ao agente antimicrobiano e as bactérias tornam-se suscetíveis a esses agentes bactericidas.<sup>35</sup> Curativos têm sido usados em feridas por muitos anos para tratar as crônicas contaminadas e infectadas, e o efeito bactericida

de curativos contendo prata tem sido particularmente bem documentado contra as bactérias planctônicas<sup>36-40</sup> e biofilmes.<sup>41-44</sup> A perturbação física e ruptura remoção de um biofilme (desbridamento) são considerados o a método mais eficaz de redução da carga biológica do biofilme.<sup>45</sup> Uma estratégia para o tratamento de biofilmes de feridas envolve o uso de curativos que combinam uma ação desestabilizadora sobre o biofilme com a presença de agentes antimicrobianos.<sup>46</sup> A ruptura do biofilme e eficaz remoção de bactérias liberadas do leito da ferida por um curativo não medicamentoso oferece um mecanismo alternativo para a redução da carga biológica da ferida sem utilizar agentes antimicrobianos ativos. No entanto, se não for controlada, a dispersão do biofilme poderia resultar na liberação e distribuição de bactérias que têm o potencial de colonizar novas áreas ou recolonizar locais previamente colonizados.<sup>47</sup>

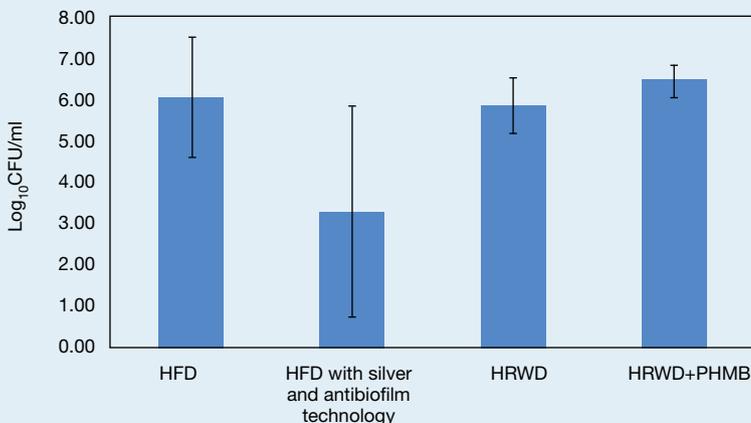
**Captação bacteriana**

As propriedades químicas dos curativos demonstram poder afetar a estabilidade do biofilme e oferecendo novo mecanismo pelo qual os curativos agem sobre os biofilmes nas feridas. Essa intervenção antimicrobiana passiva depende do aproveitamento das características químicas e físicas de:

- Os microrganismos, tais como sua carga elétrica, natureza hidrofóbica/ hidrofílica e / ou
- Componentes do curativo, por exemplo, o produto químico composição, natureza hidrofóbica / hidrofílica, estrutura tridimensional da fibra e propriedades do gel, com capacidade para promover interações entre curativos com bactérias e componentes do biofilme.<sup>20,48,49.</sup>

As interações entre curativos não medicamentosos, incluindo curativos absorventes e superabsorventes, e bactérias resulta na absorção e retenção de microrganismos dentro do corpo do curativo e remoção de bactérias do leito da ferida durante uma troca de curativo. A redução resultante da biocarga na ferida pode, portanto, ser alcançada sem o uso de quaisquer agentes antimicrobianos "ativos". Foi sugerido que as forças eletrostáticas entre os materiais de revestimento e os principais componentes dos biofilmes resultam na desestabilização e ruptura da estrutura dos biofilmes<sup>50</sup> e imobilização de bactérias.<sup>51</sup> Interações hidrofóbicas/hidrofílicas entre os materiais de curativos as bactérias também foi proposto como mecanismo para a ligação de bactérias ao curativo.<sup>48</sup> O inchaço dos materiais absorventes e superabsorventes (como fibras e partículas) usados em alguns curativos também podem desempenhar um papel fundamental na captação e retenção de bactérias (e dos componentes derivados de feridas do biofilme desvitalizado). Materiais gelificantes altamente absorventes do curativo incham ao contato com o fluido, como exsudato de ferida, levando à formação de um gel. Bactérias atraídas para o corpo desses curativos gelificantes durante o processo de absorção de fluidos são presos via interações fibra-bactéria e, em seguida, imobilizado dentro do gel formado.<sup>52,53</sup> Alguns curativos para

**Fig 7.** *Staphylococcus aureus* viável recuperado de 24 horas pré-formado biofilmes de pele suína após tratamento de 24 horas com curativos



HRWD—hydro-responsive wound dressing; HFD—hydrofibre foam dressing; PHMB—polyhexamethylene biguanide;

feridas exploram os componentes materiais de o curativo para remover bactérias da ferida e para manter os microrganismos dentro do núcleo do curativo.<sup>52-55</sup> Sequestro e captura de bactérias dentro da estrutura de um curativo feito de materiais absorventes reduzem a ferida bacteriana bioburden. A capacidade de curativos de feridas para sequestrar e imobilizar as células bacterianas no curativo já foi descrito.<sup>48,56</sup> Esta propriedade é agora um fato reconhecido para controlar a infecção da ferida.<sup>46</sup> Os resultados aqui apresentados sugerem que o SAP de HRWDs pode facilitar o sequestro e imobilização bacteriana.

Comparando os dados HRWD + PHMB na Fig 5 com os resultados do experimento anterior (Fig 4) sugerimos que a estrutura do núcleo interno do SAP seja importante para a ação de matar do PHMB em HRWD. Há um aumento no número de bactérias entre 30 minutos e 24 horas na (Fig 5) onde o núcleo SAP é removido o curativo em comparação com uma diminuição observada na (Fig 4) vestir-se intacto. No curativo intacto, as bactérias são assumidas e a estrutura restrita do SAP dentro do curativo intacto traz as bactérias de forma eficiente em contato próximo com o PHMB vinculado. Quando o núcleo interno é removido e testado, observamos que a estrutura do SAP foi alterada e as partículas não são mantidas restritas juntas. Como resultado, há um contato menos eficiente entre as bactérias e o PHMB ligado. Juntos, os dados sugerem que a estrutura do núcleo interno de o curativo é importante para o funcionamento do aspecto antimicrobiano do curativo.

PHMB fracamente ligado ao HRWD poderia teoricamente ser lançado no meio ambiente e tem uma ação antimicrobiana significativa. No entanto, os dados fornecem evidência de que HRWD + PHMB não libera atividade antimicrobiana e que a ação antimicrobiana está estreitamente ligada ao núcleo SAP.

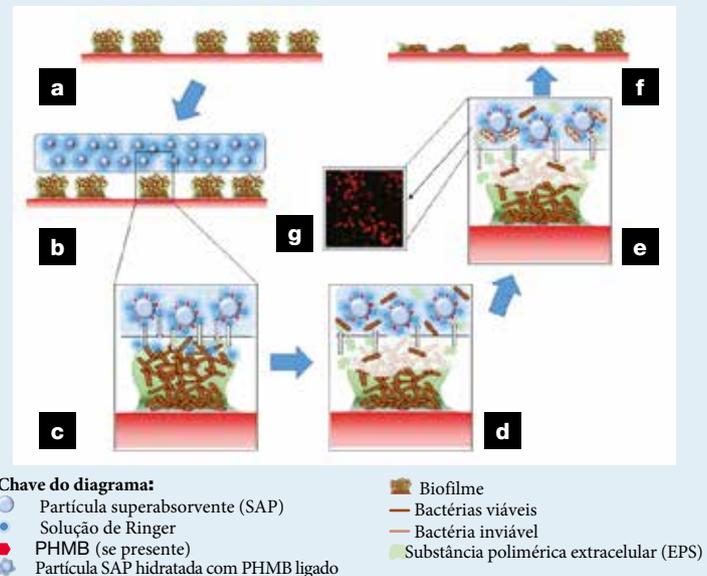
Ao aproveitar as propriedades físicas dos curativos, diminui a preocupação com o desenvolvimento de microrganismos resistentes, pois é improvável que as bactérias adquiriram resistência às características físicas dos materiais de curativo. Além disso, a matança "cobertor" de agentes antimicrobianos e uma conduta mais suave para reduzir o a biocarga bacteriana pode ser preferida. Um documento recente EWMA sugeriu que, apesar de haver uma conexão clara entre a presença de microrganismos em uma ferida e a capacidade de cicatrização da ferida, 20 essa conexão não é ainda perfeitamente compreendida. Parece, no entanto, que nem todos os microrganismos precisam ser eliminados de uma ferida.

### Mecanismo proposto para ação antimicrobiana de HRWD

A Figura 8 resume os pontos-chave da proposta mecanismo de ação antimicrobiana para HRWDs.

HRWDs são caracterizados pela presença de partículas superabsorventes de poli acrilato 'ativadas' pela presença da solução da Ringer, e este arranjo especial fornece um enxágue contínuo e efeito de absorção para ajudar no desbridamento da ferida e preparo do leito da ferida.

**Fig 8.** Diagrama esquemático da ação proposta do antibiofilme de HRWD. Biofilme ligado superfície da ferida (a). Aplicação de HRWD (b). Liberação da solução de Ringer de núcleo de curativo promovendo ação de desbridamento de HRWD (c).<sup>57,58</sup> Ruptura de biofilme pela presença de HRWD, liberando bactérias e fragmentos de EPS que são absorvidos no núcleo interno do curativo (d). Retenção de bactérias levadas para HRWD onde são mortas quando colocados em contato próximo com o PHMB (se houver). Observe que há morte mínima de bactérias dentro do biofilme remanescente (e). A remoção do curativo remove bactérias e fragmentos de EPS (f). Severamente fragmentos de biofilme interrompidos permanecem na superfície da ferida suscetíveis a mais ação de desbridamento por HRWD. Coloração VIVA / MORTA de bactérias retidas dentro Núcleo HRWD (g). Observe as numerosas bactérias não viáveis (vermelho) no HRWD.



Assim os HRWDs são uma ferramenta de desbridamento eficaz que leva à remoção de tecido desvitalizado de leitos de feridas.<sup>57,58</sup> Tecidos desvitalizados no leito da ferida são reservatórios para a residência de bactérias tanto planctônicas quanto as envoltas no biofilme.<sup>58</sup> O benefício clínico da atividade de sequestro e retenção de microrganismos pelo HRWD foi recentemente demonstrado em um estudo não comparativo de tratamento de uma variedade de feridas agudas e crônicas em 100 pacientes.<sup>59</sup> Os pacientes foram tratados com HRWD por duas semanas ou por um mínimo de quatro trocas de curativo como parte de seu regime de tratamento usual. Como parte da avaliação da eficácia do preparo do leito da ferida pelo o curativo, foi observado o número de infecções de feridas diagnosticadas durante o período de avaliação. No início do estudo, 22 pacientes mostraram sinais de infecção da ferida, mas este número reduzido a apenas dois pacientes ao final da observação período. No final do estudo, 13 pacientes não apresentaram nenhuma indicação de infecção da ferida (o resultado dos sete pacientes restantes era desconhecido).<sup>59</sup> Os autores sugerem que o rápido desbridamento do tecido necrótico, incluindo biofilme, reduz a carga biológica da ferida e promove a progressão da cicatrização da ferida.

Os resultados aqui apresentados sugerem outros mecanismos "físicos" para os HRWDs reduzirem a carga biológica de feridas sem a necessidade de agentes antimicrobianos. Esses mecanismos incluem a ruptura e dispersão de biofilmes e a absorção de bactérias planctônicas liberadas do biofilme para o curativo, seguido do sequestro e retenção (aprisionamento) de bactérias dentro da estrutura matriz do núcleo interno SAP do HRWD.

### Questões reflexivas

- ● Quais são os benefícios do uso de curativos não medicamentosos?
- ● Quais são os mecanismos de ação antimicrobiana dos curativos hidro-responsivos (HRWD)?
- ● Identifique algumas feridas (de sua própria experiência clínica) onde você acha que curativos antimicrobianos não medicamentosos, como HRWD, podem ser úteis.

Além disso, quando o PHMB está vinculado ao SAP, há um efeito antimicrobiano pelo curativo quando bactérias sequestradas são colocadas em contato físico mais próximo com o agente antimicrobiano ligado. A ação antimicrobiana ocorre apenas sobre as bactérias captadas pelo curativo. Uma redução adicional na patogenicidade é observada graças à capacidade do curativo de absorver e reter proteinases prejudiciais liberadas por bactéria patogênica. As bactérias podem contribuir para os níveis excessivos de enzima degradadora de proteína (proteinase) presente em feridas crônicas causadas pelas bactérias. O sequestro e a retenção de bactérias da superfície da ferida ajudarão a reduzir os níveis de proteinases derivadas de bactérias presentes dentro do ambiente de feridas crônicas. Estudos têm também mostrado que o SAP presente em HRWDs é capaz de se ligar diretamente as enzimas bacterianas e efetivamente reduzir as atividades de proteinase.<sup>60,61</sup> Estudos preliminares também mostraram que o HRWD sequestra a matriz humana metaloproteinases (MMPs) MMP-2 e MMP-9, ambas enzimas que contribuem para o ambiente prejudicial a evolução da ferida crônica.<sup>62,63</sup>

### Limitações e trabalhos futuros

Estes são estudos de laboratório e, portanto, não recriam as complexas condições clínicas em que o curativo deve funcionar. Além disso, nestas condições de *in vitro*, o biofilme gerado não será idêntico aos biofilmes encontrados em feridas. Vários estudos descritos neste relatório foram conduzidos usando biofilmes estabelecidos em superfícies não biológicas, tal como sobre plástico, usando condições de crescimento em ensaio de laboratório padrão, sob essas circunstâncias, é improvável que simule a formação biofilme e sua maturação visto *in vitro*. Esses estudos também realizados usando culturas de bactérias de espécie única e diferentes da situação *in vitro*, onde biofilmes clinicamente relevantes são poli microbianos. O uso de condições e substratos de crescimento bem definidos juntamente com a escolha por uma cultura de uma única espécie, foram escolhidos pela simplicidade e controle de variáveis experimentais. Outros estudos *in vitro* devem ser realizados para investigar a interação de HRWD contra biofilmes poli microbianos. No entanto, os estudos de laboratório oferecem com certeza alguns *insights* em relação a estratégias de tratamento e são um primeiro passo para demonstrar que há atividade antibiofilme nos curativos HRWD. É preditivo de um cenário clínico, mas esses resultados devem ser estendidos em outros estudos de laboratório e confirmado por observações clínicas.

### References

- 1 Geesey GG, Richardson WT, Yeomans HG et al. Microscopic examination of natural sessile bacterial populations from an alpine stream. *Can J Microbiol* 1977; 23(12):1733-1736. doi:10.1139/m77-249
- 2 James GA, Swogger E, Wolcott R et al. Biofilms in chronic wounds. *Wound Repair Regen* 2008; 16(1):37-44. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2007.00321.x>
- 3 Bjarnsholt T. The role of bacterial biofilms in chronic infections. *APMIS Suppl* 2013; 136:1-51. <https://doi.org/10.1111/apm.12099>
- 4 Davis SC, Ricotti C, Cazzaniga A et al. Microscopic and physiologic evidence for biofilm-associated wound colonization *in vivo*. *Wound Repair*

### Conclusão

O restabelecimento de um biofilme depende de bactérias planctônicas. Essas células flutuantes são mais suscetíveis a agentes antimicrobianos ou curativos capazes de sequestrar bactérias planctônicas. A remoção de biofilme (via desbridamento eficaz), juntamente com a prevenção de formação de novo biofilme (via sequestro bacteriano / via agentes antimicrobianos) provavelmente ofereciam uma excelente estratégia antibiofilme. Este estudo demonstrou atividade antibacteriana *in vitro* do HRWD contra microrganismos planctônicos e bactérias sésseis residentes em populações bacterianas aderidas e biofilmes. O tratamento com HRWD resultou na ruptura do biofilme e na liberação de fragmentos de biofilme, de bactérias e de proteinases bacterianas que podem ser captados pela alta capacidade de absorção de o SAP contido no curativo. Uma vez dentro do curativo, esses componentes do biofilme são sequestrados e retidos na matriz. Quando o HRWD contém PHMB irreversivelmente ligado a ele, localização das bactérias próximas ao agente antimicrobiano resulta em adicional de microrganismos.

A atividade antimicrobiana desses curativos pode ter um valor terapêutico significativo e devem ser considerados para o tratamento de biofilmes em feridas infectadas. A presença de uma população de microrganismos com uma susceptibilidade diminuída a os antimicrobianos atuais aumenta o risco para a saúde do paciente. Embora tenha havido pouco trabalho realizado para avaliar o desenvolvimento de resistência a outros agentes antimicrobianos, é provável que a resistência possa desenvolver contra qualquer antimicrobiano tópico.<sup>20</sup> Como crônicas infecções são, por sua natureza, de longa duração, o uso continuado de agentes antimicrobianos provavelmente aumentaria a chance de desenvolvimento de variantes bacterianas resistentes e propagariam seu crescimento. Há necessidade de usar curativos de ação antimicrobiana passiva juntamente com a inclusão de intervenção antimicrobiana ativa o que forneceria controle apropriado da carga biológica. **JWC**

- Regen 2008; 16(1):23-29. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2007.00303.x>
- 5 Malone M, Bjarnsholt T, McBain AJ et al. The prevalence of biofilms in chronic wounds: a systematic review and meta-analysis of published data. *J Wound Care* 2017; 26(1):20-25. <https://doi.org/10.12968/jowc.2017.26.1.20>
- 6 Swanson T, Wolcott RD, Wallis H, Woodmansey EJ. Understanding biofilm in practice: a global survey of health professionals. *J Wound Care* 2017; 26(8):426-440. <https://doi.org/10.12968/jowc.2017.26.8.426>
- 7 Webb R. A chronic case of confusion. *J Wound Care* 2017; 26(8):421. <https://doi.org/10.12968/jowc.2017.26.8.421>
- 8 Bjarnsholt T, Kirketerp-Møller K, Jensen PØ et al. Why chronic wounds will not heal: a novel hypothesis. *Wound Repair Regen* 2008; 16(1):2-10. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2007.00321.x>

- doi.org/10.1111/j.1524-475X.2007.00283.x
- 9** Flemming HC. The perfect slime. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2011; 86(2):251-259. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.04.025>
- 10** Bowler PG, Davies BJ. The microbiology of infected and noninfected leg ulcers. *Int J Dermatol* 1999; 38(8):573-578. <https://tinyurl.com/y72q7d6q>
- 11** Metcalf DG, Bowler PG. Biofilm delays wound healing: a review of the evidence. *Burns Trauma* 2013; 1(1):5-12. <https://tinyurl.com/yc95fwqk>
- 12** Wolcott R, Sanford N, Gabrilis R et al. Microbiota is a primary cause of pathogenesis of chronic wounds. *J Wound Care* 2016; 25(Suppl 10):S33-S43. <https://doi.org/10.12968/jowc.2016.25.Sup10.S33>
- 13** Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol* 2010; 8(9):623-633. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>
- 14** Gilbert P, Maira-Litran T, McBain AJ et al. The physiology and collective recalcitrance of microbial biofilm communities. *Adv Microb Physiol* 2002; 46:202-256. [https://doi.org/10.1016/S0065-2911\(02\)46005-5](https://doi.org/10.1016/S0065-2911(02)46005-5)
- 15** Omar A, Wright JB, Schultz G et al. Microbial biofilms and chronic wounds. *Microorganisms*. 2017; 5(1):9. <https://tinyurl.com/ycnrvzbd>
- 16** Stewart PS, William Costerton J. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 2001; 358(9276):135-138. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(01\)05321-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(01)05321-1)
- 17** Alhede M, Alhede M. The biofilm challenge. *EWMA J* 2014;14(1):54-58.
- 18** Ceri H, Olson ME, Stremick C et al. The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *J Clin Microbiol* 1999; 37(6):1771-1776
- 19** European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), European Medicines Agency. (EMA). ECDC/EMA Joint technical report. The bacterial challenge: time to react. A call to narrow the gap between multidrug resistant bacteria in the EU and the development of new antibacterial agents. European Centre for Disease Prevention and Control, 2009
- 20** Gottrup F, Apelqvist J, Bjarnsholt T et al. EWMA document: antimicrobials and non-healing wounds – evidence, controversies and suggestions. *J Wound Care* 2013; 22(5 Suppl):S1-S92. <https://doi.org/10.12968/jowc.2013.22.Sup5.S1>
- 21** Kirker KR, James GA. In vitro studies evaluating the effects of biofilms on wound-healing cells: a review. *APMIS* 2017; 125(4):344-352. <https://doi.org/10.1111/apm.12678>
- 22** Lebeaux D, Chauhan A, Renuedes O, Beloin C. From in vitro to in vivo models of bacterial biofilm-related infections. *Pathogens* 2013; 2(2):288-356. <https://doi.org/10.3390/pathogens2020288>
- 23** McBain AJ. Chapter 4: In vitro biofilm models: an overview. *Adv Appl Microbiol* 2009; 69:99-132. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(09\)69004-3](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(09)69004-3)
- 24** Hill KE, Malic S, McKee R et al. An in vitro model of chronic wound biofilms to test wound dressings and assess antimicrobial susceptibilities. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65(6):1195-1206. <https://tinyurl.com/ybl7yjsu>
- 25** Lipp C, Kirker K, Agostinho A et al. Testing wound dressings using an in vitro wound model. *J Wound Care* 2010; 19(6):220-226. <https://doi.org/10.12968/jowc.2010.19.6.48468>
- 26** Percival SL, Bowler P, Woods EJ. Assessing the effect of an antimicrobial wound dressing on biofilms. *Wound Repair Regen* 2008; 16(1): 52-57. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2007.00350.x>
- 27** Hakonen B, Lönnberg LK, Larkö E, Blom KA. A novel qualitative and quantitative biofilm assay based on 3D soft tissue. *Int J Biomater* 2014; 2014:768136. <https://doi.org/10.1155/2014/768136>
- 28** Charles CA, Ricotti CA, Davis SC et al. Use of tissue-engineered skin to study in vitro biofilm development. *Dermatol Surg* 2009; 35(9):1334-1341. <https://doi.org/10.1111/j.1524-4725.2009.01238.x>
- 29** Lone AG, Atci E, Renslow R et al. *Staphylococcus aureus* induces hypoxia and cellular damage in porcine dermal explants. *Infect Immun* 2015; 83(6):2531-2541. <https://doi.org/10.1128/IAI.03075-14>
- 30** Donlan RM, Murga R, Carpenter J et al. Monochloramine disinfection of biofilm-associated *Legionella pneumophila* in a potable water model system. In: *Legionella*, pp. 406-410. In: Marre R et al (eds). American Society for Microbiology, 2002
- 31** Donlan RM, Piede JA, Heyes et al. A model system for growing and quantifying *Streptococcus pneumoniae* biofilms in situ and in real time. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70(8):4980-4988. <https://tinyurl.com/ycm9o9sf>
- 32** Goeres DM, Loetterle LR, Hamilton MA et al. Statistical assessment of a laboratory method for growing biofilms. *Microbiology* 2005; 151(3):757-762. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27709-0>
- 33** Bruggisser R. Bacterial and fungal absorption properties of a hydrogel dressing with a superabsorbent polymer core. *J Wound Care* 2005; 14(9):438-442. <https://doi.org/10.12968/jowc.2005.14.9.26839>
- 34** Data on file Perfectus Biomed Report. Report ID: PB046-013 B-V1, dated 08-Sept-2017
- 35** Finnegan S, Percival SL. EDTA: an antimicrobial and antibiofilm agent for use in wound care. *Adv Wound Care* 2015; 4(7):415-421. <https://doi.org/10.1089/wound.2014.0577>
- 36** Aramwit P, Muangman P, Namviriyachote N et al. In vitro evaluation of the antimicrobial effectiveness and moisture binding properties of wound dressings. *Int J Mol Sci* 2010; 11(8):2864-2874. <https://tinyurl.com/y7gy5taj>
- 37** Castellano JJ, Shafi SM, Ko F et al. Comparative evaluation of silver-containing antimicrobial dressings and drugs. *Int Wound J* 2007; 4(2):114-122. <https://doi.org/10.1111/j.1742-481X.2007.00316.x>
- 38** Cavanagh MH, Burrell RE, Nadworny PL. Evaluating antimicrobial efficacy of new commercially available silver dressings. *Int Wound J* 2010; 7(5):394-405. <https://doi.org/10.1111/j.1742-481X.2010.00705.x>
- 39** Edwards-Jones V. Antimicrobial and barrier effects of silver against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Wound Care* 2006; 15(7):285-290. <https://doi.org/10.12968/jowc.2006.15.7.26951>
- 40** Ip M, Lui SL, Poon VK et al. Antimicrobial activities of silver dressings: an in vitro comparison. *J Med Microbiol* 2006; 55(Pt 1):59-63. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.46124-0>
- 41** Hammond AA, Miller KG, Kruczek CJ et al. An in vitro biofilm model to examine the effect of antibiotic ointments on biofilms produced by burn wound bacterial isolates. *Burns* 2011; 37(2):312-321. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2010.09.017>
- 42** Percival SL, Bowler PG, Dolman J. Antimicrobial activity of silver-containing dressings on wound microorganisms using an in vitro biofilm model. *Int Wound J* 2007; 4(2):186-191. <https://doi.org/10.1111/j.1742-481X.2007.00296.x>
- 43** Thomason H, Beasley A. A new innovation in treating infected wounds and disrupting biofilms. *Wounds UK* 2016; 12(1):78-84.
- 44** Thorn RM, Austin AJ, Greenman J et al. In vitro comparison of antimicrobial activity of iodine and silver dressings against biofilms. *J Wound Care* 2009; 18(8):343-346. <https://doi.org/10.12968/jowc.2009.18.8.43635>
- 45** Wolcott RD, Kennedy JP, Dowd SE. Regular debridement is the main tool for maintaining a healthy wound bed in most chronic wounds. *J Wound Care* 2009; 18(2):54-56. <https://doi.org/10.12968/jowc.2009.18.2.38743>
- 46** Said J, Walker M, Parsons D et al. An in vitro test of the efficacy of an anti-biofilm wound dressing. *Int J Pharm* 2014; 474(1-2):177-181. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.08.034>
- 47** Phillips PL, Wolcott RD, Fletcher J, Schultz GS. Biofilms made easy. *Wounds International* 2010; 1(3)
- 48** Cooper R, Jenkins L. Binding of two bacterial biofilms to dialkyl carbamoyl chloride (DACC)-coated dressings in vitro. *J Wound Care* 2016; 25(2):76-82. <https://doi.org/10.12968/jowc.2016.25.2.76>
- 49** Sharp C. Managing the wound with Hydration Response Technology. *Wounds UK* 2010; 6(2):112-115.
- 50** Desroche N, Drobot C, Janod P, Guzzo J. Antibacterial properties and reduction of MRSA biofilm with a dressing combining polyabsorbent fibres and a silver matrix. *J Wound Care* 2016; 25(10):577-584. <https://doi.org/10.12968/jowc.2016.25.10.577>
- 51** Wiegand C, Abel M, Muldoon J et al. SAP-containing dressings exhibit sustained antimicrobial effects over 7 days in vitro. *J Wound Care* 2013; 22(3):120-127. <https://doi.org/10.12968/jowc.2013.22.3.120>
- 52** Larkö E, Persson A, Blom K. Effect of superabsorbent dressings in a 3D acellular tissue model of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *J Wound Care* 2015; 24(5):204-210. <https://doi.org/10.12968/jowc.2015.24.5.204>
- 53** Ljungh A, Yanagisawa N, Wadström T. Using the principle of hydrophobic interaction to bind and remove wound bacteria. *J Wound Care* 2006; 15(4):175-180. <https://doi.org/10.12968/jowc.2006.15.4.26901>
- 54** Kramer A, Maassen A. Wound dressings from a hygienic point of view using the example of Sorbion Sachet S. *GMS Krankenhhyg Interdiszip*. 2009; 4(2):Doc11. <https://doi.org/10.3205/dgkh000136>
- 55** Newman GR, Walker M, Hobot JA et al. Visualisation of bacterial sequestration and bactericidal activity within hydrating Hydrofiber wound dressings. *Biomaterials* 2006; 27(7):1129-1139. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.07.046>
- 56** Bowler PG, Jones SA, Davies BJ et al. Infection control properties of some wound dressings. *J Wound Care* 1999; 8(10):499-502. <https://doi.org/10.12968/jowc.1999.8.10.26356>
- 57** Ousey K, Rippon MG, Rogers AA. *Hydrotherapy made easy*. London: Wounds UK, 2016.
- 58** Ousey K, Rogers AA, Rippon MG. HydroClean plus: a new perspective to wound cleansing and debridement. *Wounds UK* 2016;12(1):94-104.
- 59** Hodgson H, Davidson D, Duncan A et al. A multicentre, clinical evaluation of a hydro-responsive wound dressing: the Glasgow experience. *J Wound Care* 2017; 26(11):642-650. <https://doi.org/10.12968/jowc.2017.26.11.642>
- 60** Eming S, Smola H, Hartmann B et al. The inhibition of matrix metalloproteinase activity in chronic wounds by a polyacrylate superabsorbent. *Biomaterials* 2008; 29(19):2932-2940. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.03.029>
- 61** Smola H. Bacterial proteases and their inhibition – the missing link in normalizing the hostile environment in chronic wounds. Presented at EWMA Meeting, Harrogate, UK, 2005
- 62** Data on file Perfectus Biomed Report. Report ID: PB046-005-V1, dated 29-Nov-2016.
- 63** Lazaro JL, Izzo V, Meaume S et al. Elevated levels of matrix metalloproteinases and chronic wound healing: an updated review of clinical evidence. *J Wound Care* 2016; 25(5):277-287. <https://doi.org/10.12968/jowc.2016.25.5.277>

