

WORLD UNION  
OF  
WOUND HEALING SOCIETIES



# O PAPEL DE CURATIVOS NÃO MEDICAMENTOSOS PARA GERENCIAMENTO DA INFECÇÃO DA FERIDA

---

Reconhecimento e gerenciamento de infecção e biofilme no contexto da administração antimicrobiana

---

Curativos não medicamentosos para feridas: definição de seu papel

---

Curativos não medicamentosos em feridas infectadas ou com risco de infecção: como usá-los na prática

---

**Publicado por**

Wounds International  
108 Cannon Street  
London EC4N 6EU, UK  
Tel: +44 (0)203 735 8244  
info@omniamed.com  
www.woundsinternational.com



© Wounds International, 2020



O Documento de posicionamento foi produzido pela Wounds International e lançado no 6º congresso da World Union of Wound Healing Societies de 2020 em Abu Dhabi, Emirados Árabes Unidos

**Para citar este documento:**

World Union of Wound Healing Societies (2020)  
*A função dos curativos não medicamentosos para o gerenciamento de infecções em feridas.*  
London: Wounds International. Disponível em:  
www.woundsinternational.com

Download gratuito disponível em:  
www.woundsinternational.com

Todos os direitos reservados ©2020. Não é permitida a reprodução, cópia ou transmissão desta publicação sem uma autorização por escrito.

Nenhum parágrafo desta publicação pode ser reproduzido, copiado ou transmitido sem uma permissão por escrito ou de acordo com as disposições da Lei de direitos autorais, designs e patentes de 1988 ou sob os termos de qualquer licença que permita a cópia limitada emitida pela Copyright Licensing Agency, 90 Tottenham Court Road, Londres, W1P 0LP.

As opiniões expressas nesta publicação são próprias dos autores e não representam necessariamente as opiniões da HARTMANN.



Com apoio de uma concessão educacional da HARTMANN.

**T**odos os tipos de feridas tem o potencial de desenvolver infecções graves, que em alguns casos podem levar à cronicidade, infecções ósseas, deficiências de longo prazo e até morte. As bactérias em uma ferida podem existir na forma tópica crescente ou de biofilme e o tratamento geralmente é realizado com o uso de antimicrobianos ou antibióticos. Há uma preocupação sobre o tratamento de infecções, causada pelo aumento da resistência antimicrobiana de muitos patógenos bacterianos comuns e pelo uso inadequado dos agentes antimicrobianos.

A administração de antimicrobianos busca promover o uso adequado de antibióticos e agentes antimicrobianos. Desde a introdução dos princípios de administração de antimicrobianos, o número geral de prescrições de antibióticos (entre 2013 e 2017) caiu 4,5%<sup>[1]</sup>. Mesmo assim, são necessárias novas perspectivas para ajudar a combater a ameaça contínua e real da resistência antimicrobiana nas feridas.

O documento 1 “Reconhecimento e gerenciamento de infecção e biofilme no contexto de administração antimicrobiana” define o cenário dos principais aspectos da fisiologia e da estrutura do biofilme, junto com os desafios e as abordagens de tratamento atuais para identificar e tratar o biofilme nas feridas. Uma nova abordagem oferece aos médicos a oportunidade de reduzir o uso excessivo de agentes microbianos no tratamento de feridas e descreve a importância da administração antimicrobiana.

Documento 2 “Curativos não medicamentosos e o seu papel no tratamento de feridas”: Define o foco do papel do mecanismo de ação conhecido como Curativos não medicamentosos para feridas (NMWDs) no gerenciamento da biocarga bacteriana em feridas agudas e crônicas, propondo uma definição clara, indicações de uso e evidências que apoiam sua efetividade.

O documento 3 “Curativos não medicamentosos para feridas infectadas ou com risco de infecção: como usá-los na prática” abrange o uso dos NMWDs na prática, incluindo quando considerar o uso de NMWDs, razões para o uso e experiência clínica compartilhada em exemplos de casos específicos.

## REFERÊNCIAS

1. Sharland M and Wilson P. *NICE impact antimicrobial resistance, 2018*. NICE, London, UK. Disponível em: <https://www.nice.org.uk/Media/Default/About/what-we-do/Into-practice/measuring-uptake/NICEimpact-antimicrobial-resistance.pdf> (acesso em 18 de dezembro de 2019).

## Autores

**Thomas Bjarnsholt**, Costerton Biofilm Center, Departamento de imunologia e microbiologia, Faculdade de ciências médicas e saúde, Universidade de Copenhagen, Dinamarca; Departamento de microbiologia clínica, Rigshospitalet, Dinamarca

**Val Edwards-Jones**, Instituto de integridade cutânea e prevenção de infecções, Universidade de Huddersfield, Reino Unido

**Matthew Malone**, PhD, FFPM RCPS (Glasg), diretor de pesquisa, Unidade acadêmica de preservação de membros e pesquisa de feridas do sudoeste de Sydney, em Sydney, Austrália

**Karen Ousey**, professora de integridade cutânea no Instituto de integridade cutânea e prevenção de infecções, Universidade de Huddersfield, Reino Unido

**Mark Rippon**, membro pesquisador clínico visitante, Universidade de Huddersfield; consultor de marketing médico, Daneriver Consultancy Ltd, Holmes Chapel, Reino Unido

**Alan Rogers**, consultor autônomo de tratamento de feridas, Flintshire, Reino Unido

**Samantha Westgate**, CEO, Perfectus Biomed Limited, Reino Unido

**Sabine Eming**, professora de dermatologia e diretora do Centro interdisciplinar de cicatrização de feridas, Hospital universitário de Colônia, Alemanha

**Isabelle Fromantin**, especialista em feridas e cicatrização, Instituto Curie, França

**Astrid Probst**, enfermeira avançada, Gerenciamento de feridas, Kreiskliniken Reutlingen GmbH, Reutlingen, Alemanha

**Hans Smola**, professor de dermatologia, Universidade de Colônia, Alemanha; diretor médico, PAUL HARTMANN AG, Alemanha

**Hui-Mei Yang**, enfermeira, Departamento de endocrinologia e metabolismo, Chang Gung Memorial Hospital Linkou Branch, Taoyuan, Taiwan, R.O.C

**Jiun-Ting Yeh**, cirurgião plástico, Divisão de trauma, Departamento de cirurgia plástica e reconstrutiva, Chang Gung Memorial Hospital Linkou Branch, Taoyuan, Taiwan, R.O.C

## Revisor principal

**Steven Percival**, CEO, 5D Health Protection Group Ltd; diretor, Centro de excelência em ciência de biofilme (CEBS) Liverpool, Reino Unido; professor (honorário), Universidade de Liverpool, Reino Unido

## Revisores: Diretores do comitê científico internacional do WUWHS

**Afsaneh Alavi**, professor, dermatologista, Universidade de Toronto, Toronto, Canadá

**Dieter Mayer**, professor, consultor sênior de cirurgia vascular e diretor do tratamento de feridas, Suíça

# Reconhecimento e gerenciamento de infecção e biofilme no contexto de administração antimicrobiana

**A** acumulação de bactérias e fungos e o papel deles na saúde e nas doenças humanas tem sido escopo de muitas pesquisas nas últimas duas décadas. Houve alguns debates sobre como definir melhor os biofilmes microbianos, e a nomenclatura variou muito na literatura. A associação de superfície é uma condição necessária para a formação de biofilme? A maturidade ou idade de um biofilme é importante? Os biofilmes se originam das células planctônicas? Caso afirmativo, o que desencadeia esse processo? Todas essas questões foram muito discutidas. No entanto, não importa se discutimos as superfícies ou se os agregados suspensos são biofilmes; o que importa é entender o contexto e o comportamento dos micro-organismos bacterianos. Portanto, o recurso mais marcante que distingue os biofilmes microbianos (agregados de micro-organismos bacterianos) dos micro-organismos planctônicos é a tolerância aos agentes antimicrobianos e a defesa do hospedeiro. Além disso, precisamos entender que células independentes em uma infecção não são iguais a bactérias planctônicas crescendo exponencialmente em uma cultura agitada. Isso significa que as infecções envolvendo biofilmes não podem ser tratadas da mesma forma que as infecções agudas.

## Caixa 1. Termo de resistência/tolerância<sup>[3]</sup>

A resistência antimicrobiana se refere a um mecanismo específico de resistência a medicamentos. A tolerância se refere à menor suscetibilidade e maior tolerância a antimicrobianos de forma não específica.

**Thomas Bjarnsholt**, Costerton Biofilm Center, Departamento de imunologia e microbiologia, Faculdade de ciências médicas e saúde, Universidade de Copenhagen; Departamento de microbiologia clínica, Rigshospitalet, Dinamarca  
**Val Edwards-Jones**, Instituto de integridade cutânea e prevenção de infecções, Universidade de Huddersfield, Reino Unido  
**Matthew Malone**, PhD, FFPM RCPS (Glasg), diretor de pesquisa, Unidade acadêmica de preservação de membros e pesquisa de feridas do sudoeste de Sydney, em Sydney, Austrália

## PRINCIPAIS ASPECTOS DA FIOLOGIA/ESTRUTURA DO BIOFILME E COMO ISSO AFETA A TERAPÊUTICA

As terapias antimicrobianas para infecções agudas com base em concentrações inibitórias mínimas (MIC; suscetibilidade do micro-organismo planctônico a antibióticos) atingem micro-organismos planctônicos de rápida multiplicação com uma grande eficácia. Infelizmente, quando essas terapias são empregadas contra micro-organismos de biofilme, que diferem muito em fisiologia e atividade, elas geralmente falham na erradicação do problema<sup>[1]</sup>. Na realidade, diversos modelos de biofilme in vitro mostraram que os biofilmes bacterianos podem suportar concentrações antimicrobianas de 100 a 1.000 vezes maiores do que os planctônicos.<sup>[2]</sup> Resistência e tolerância foram relatadas como sinônimos na definição da capacidade do biofilme suportar concentrações bem maiores de antimicrobianos (tópicos, orais e intravenosos), antissépticos e desinfetantes, mas elas implicam dois mecanismos muito diferentes (Caixa 1<sup>[3]</sup>).

As bactérias individuais podem promover resistência através de elementos genéticos móveis (como plasmídeos e transposons, permitindo a transferência horizontal de genes) ou por mutações alvo (modificando enzimas ou bombas de efluxo). Estes mecanismos familiares pelos quais micro-organismos planctônicos individuais podem resistir a concentrações altas de antimicrobianos não parecem explicar a proteção aprimorada conferida às bactérias em um biofilme. Portanto, ao descrever a capacidade de um biofilme de suportar diversos tratamentos antimicrobianos diferentes, chamamos este termo de tolerância, não de resistência. A maioria do nosso conhecimento sobre a fisiologia do biofilme foi pesquisada in vitro e identificou as principais áreas da pesquisa de tolerância do biofilme:

- Crescimento/metabolismo reduzido
- Substância polimérica extracelular (EPS)
- Bombas de efluxo
- Microambientes alterados.

Um fator dominante da tolerância do biofilme parece ser devido ao crescimento lento ou à latência da bactéria. Isso é importante, já que a maioria dos agentes antibióticos age em vias metabólicas em células bacterianas ativas. Portanto, no caso de bactérias de crescimento lento ou dominantes, os antibióticos podem ser menos efetivos. Outro possível contribuinte à tolerância do biofilme é a

produção de uma matriz de proteção, chamada EPS. Costerton et al<sup>[4]</sup> descreveu pela primeira vez um processo pelo qual as células bacterianas produziam “glicocálice” e propôs que isso fornecesse benefícios adicionais aos micro-organismos com crescimento reduzido<sup>[4]</sup>. O glicocálice foi definido como uma composição de polissacarídeos que compunham 90% de um biofilme, com menos de 10% sendo composto por bactérias<sup>[4]</sup>. A terminologia glicocálice foi redefinida anos depois para EPS e se ficou claro que o glicocálice bacteriano era mais do que apenas polissacarídeos.<sup>[5,6]</sup> O EPS é caracterizado como biopolímeros, compostos de proteínas, ácidos nucleicos, lipídeos e substâncias húmicas, permitindo a imobilização e a coesão de células bacterianas próximas. A importância da matriz de biofilme parece ter uma função, pelo menos in vitro<sup>[7,8]</sup>; no entanto, as funções dos componentes da matriz não são tão claras in vivo, já que não se sabe os componentes que a bactéria produz aqui<sup>[9]</sup>.

A função exata da tolerância do biofilme in vivo não é clara; no entanto, sabemos que o metabolismo e o crescimento bacteriano são significativamente reduzidos. O microambiente dentro da ferida pode desempenhar um papel na redução do crescimento dos micro-organismos. Estas áreas com baixo oxigênio hospedam micronichos de diferentes micro-organismos e podem explicar como a presença de anaeróbios em biofilmes de espécies mistas existe, contribui e coopera com os vizinhos aeróbicos in vitro. Estudos usando microeletrodos com microscopia confocal identificaram domínios micro com diferentes ambientes bioquímicos, incluindo alterações no pH e no oxigênio<sup>[10]</sup>. Estas alterações nos gradientes bioquímicos foram propostas como vias para inibir a ação dos antibióticos<sup>[11]</sup>.

Dados recentes de James et al (2016)<sup>[12]</sup> fornecem mais evidências para apoiar o conceito de tensões localizadas de baixo oxigênio que contribuem para a cronicidade da ferida usando microssensores de oxigênio e transcriptômica (examinando as atividades metabólicas microbianas) para estudar biofilmes in situ. James et al (2016) identificou gradientes íngremes de oxigênio e induziu respostas de estresse que limitam o oxigênio das bactérias, e estabeleceu que as atividades metabólicas do biofilme e o recrutamento de células que consomem oxigênio para os processos defensivos do hospedeiro são as vias principais de esgotamento de oxigênio<sup>[12]</sup>. Isso apoia o conceito do biofilme estabelecer e manter tensões localizadas de baixo oxigênio em uma ferida, contribuindo, assim, para a cronicidade.

## DESAFIOS E CONDUTAS DE TRATAMENTO ATUAIS PARA IDENTIFICAR E TRATAR O BIOFILME EM FERIDAS

### Predomínio de biofilmes em feridas e a função deles nas feridas

Com base na literatura atual, é evidente que a maioria das feridas crônicas tem probabilidade de conter biofilmes e eles parecem ter uma função na falta de cicatrização.<sup>[13,15]</sup> No entanto, é muito importante que os médicos e pesquisadores lembrem que as bactérias nunca são a causa primária de uma ferida crônica que não cicatriza. A etiologia subjacente pode incluir fatores do paciente hospedeiro, como diabetes, doença vascular periférica, neuropatia periférica, trauma e aumento da pressão plantar. No entanto, assim que uma ferida se estabelece em uma pessoa com diversas comorbidades, qualquer bactéria pode contribuir ou ultrapassar as causas etiológicas primárias para manter a ferida em um estado sem cicatrização, devido à resposta inflamatória contínua que as bactérias causam.

Outra consideração é de onde as bactérias vêm, tanto na primeira vez, quanto nas reinfecções. Em feridas agudas e cortes na pele de pessoas saudáveis, é ativada a resposta inflamatória inicial. No entanto, se o recrutamento de glóbulos brancos/leucócitos for prejudicado devido a fatores como insuficiência venosa, as bactérias da pele e, possivelmente, do intestino (ex. por contaminação fecal ao tomar banho) podem chegar antes e formar biofilmes não fagocitáveis. Além disso, as bactérias que entram têm maior probabilidade de entrar como agregados, e não como bactérias planctônicas livres, já que as bactérias da pele e do resto do microbioma são encontradas como pequenos agregados<sup>[16]</sup>.

### Como os biofilmes se organizam no tecido humano?

As técnicas microscópicas de análise de biofilme em feridas humanas identificaram a presença de micro-organismos agregados e planctônicos. Os micro-organismos dentro de uma ferida podem estar na superfície ou integrados mais profundamente no leito da ferida<sup>[17-20]</sup>. Os agregados bacterianos pequenos e o diâmetro deles varia de 5-200µm<sup>[21]</sup>. Eles são distribuídos heterogeneamente no leito da

ferida<sup>[22]</sup>, o que significa que eles não formam uma camada homogênea de “limo” na superfície inteira da ferida. Esses agregados, além das células independentes (bactérias planctônicas), não são visíveis macroscopicamente (ex. não são visíveis a olho nu). Também não é possível avaliar o nível de biocarga apenas pelo tamanho da ferida ou pela quantidade de fibrina, descamação ou tecido não viável.

## GENÔMICA E SUA UTILIZAÇÃO NA PESQUISA DE FERIDAS

A identificação dos patógenos causadores e/ou das comunidades microbianas dentro das feridas abertas é essencial no direcionamento da terapia. Historicamente, os médicos dependiam de técnicas de cultura convencionais que agora são reconhecidas como seletivas para micro-organismos que sobrevivem às restrições fisiológicas e nutricionais do laboratório microbiológico e eles subestimaram muito a diversidade microbiana de uma amostra. Na última década, vimos uma explosão do uso de plataformas modernas de sequenciamento de DNA e RNA que eliminaram a necessidade de criar e isolar as bactérias de uma placa de Petri com nutrientes. Junto com as crescentes publicações nessa área, houve uma complexidade cada vez maior de abordagens baseadas em moléculas e bioinformática, gerando dados potencialmente confusos usando um jargão complicado para os médicos comuns. Nesta seção, a utilização de genômica no contexto de pesquisa de feridas e biofilme será explicada com uma terminologia simples, para ajudar os leitores a entenderem o potencial (e as limitações) de tais tecnologias a fim de melhorar o tratamento de feridas.

### Sequenciamento moderno: guia do médico

O sequenciamento moderno se refere à abordagem geral à análise de DNA ou RNA de uma amostra. Existem diversas plataformas com base no sequenciamento — ex. Illumina, IoN Torrent, PacBio, Oxford Nanopore — cada uma com tecnologias próprias levemente diferentes para o sequenciamento de DNA ou RNA. Uma coisa que a maioria das plataformas de sequenciamento tem em comum é a capacidade de sequenciar muitas amostras de uma só vez e sequenciar todo o genoma de um organismo (isto geralmente é chamado de sequenciamento de alto rendimento).

As abordagens mais usadas para analisar DNA ou RNA na pesquisa de feridas podem ser separadas em categorias distintas:

- **Sequenciamento de RNA ribossômico (rRNA) 16S** — outros nomes: Sequenciamento 16S, sequenciamento de amplicon 16S, sequenciamento de rDNA 16S
- **Sequenciamento completo do genoma (shotgun)** — outros nomes: sequenciamento de shotgun, metagenômica
- **Transcriptômica de RNA** — outros nomes: metatranscriptômica, sequenciamento de RNA.

### Sequenciamento de rRNA 16S

Esta é a abordagem mais comumente utilizada na pesquisa de feridas. A 16S, como é chamada, também representa a abordagem mais simples de sequenciamento. O rRNA 16S está presente apenas em DNA bacteriano, não em humanos, e representa o alvo ideal para identificar bactérias. O gene 16S contém as informações taxonômicas que permitem que um usuário identifique a bactéria ou uma comunidade de bactérias de uma amostra, como um tecido com ferida ou cotonete. Por último, depois que as sequências de DNA são obtidas durante o processo de sequenciamento, elas precisam ser comparadas com milhões de outras sequências lidas a partir de bancos de dados disponíveis publicamente (ex. Greengenes, Silva, NCBI). Então, as sequências são comparadas com uma referência conhecida e a taxonomia é designada. Uma grande limitação do sequenciamento 16S é a leitura curta do DNA, o que significa que a identificação taxonômica das bactérias geralmente só é possível no nível de gênero (ex. *Estafilococo*). Portanto, a utilidade clínica é limitada, considerando que o tratamento por antibióticos atualmente é orientado pela cultura convencional capaz de identificar as espécies de patógeno e as suscetibilidades do antibiótico. A Tabela 1 descreve outras vantagens e desvantagens do sequenciamento 16S.

Tabela 1. Vantagens e desvantagens do sequenciamento 16S <sup>[23-25]</sup>	
Vantagens	Desvantagens (limitações)
Custo (custo no momento < US\$ 50)	Geralmente consegue identificar apenas o nível de gênero da bactéria (ex. <i>Staphylococcus</i> ). Portanto, pode ser limitante para fins clínicos
A mais fácil das abordagens moleculares e pode ser realizada rapidamente	Pode sequenciar bactérias vivas e mortas
Não é difícil computacionalmente	Apenas identificará quais bactérias estão presentes e não identifica a função ou comportamento delas
Não depende da cultura e pode identificar bactérias com crescimento lento (biofilme) ou bactérias que não podem ser criadas em cultura. Além disso, pode fornecer uma visão estendida das comunidades microbianas nas feridas	É difícil interpretar os dados no contexto do tratamento clínico e o que significa ter muito mais bactérias e de tipos diferentes dentro de uma ferida
Pode ser combinado com abordagens bioinformáticas poderosas para entender melhor as comunidades microbianas nas feridas e como elas respondem ao tratamento	Os dados geralmente são obtidos de amostras de diversos pacientes, mas isso pode distorcer os dados, uma vez que cada paciente pode ter um microbioma de importância clínica levemente diferente

### Sequenciamento completo do genoma (shotgun)

Esta abordagem molecular baseada no DNA oferece a oportunidade de um insight mais profundo sobre o microbioma da ferida e sua função potencial. Diferente do sequenciamento 16S, que amplifica apenas o gene 16S, o sequenciamento completo do genoma pesquisa todo o DNA dentro de uma amostra em uma abordagem randômica “semelhante a uma espingarda”. Desta forma, é possível caracterizar não apenas a diversidade microbiana pelo gene 16S, mas, também, outros genes do hospedeiro e do micróbio (ex. virulência, patogenicidade ou resistência antimicrobiana). Resumindo, esta abordagem pode fornecer informações sobre o arsenal de genes da bactéria ou do grupo de bactérias; no entanto, não será possível saber se estes genes são ativados no leito da ferida.

### Transcriptômica de RNA

Resumidamente, o exame de DNA fornece uma imagem estática do que um micro-organismo pode fazer, enquanto medir o RNA pode fornecer insight sobre o que o micro-organismo está fazendo realmente naquele momento específico. As bactérias podem ter um repertório de genes para diversas funções, como resistência antimicrobiana. No entanto, isto não significa que os genes serão expressados. Para eliminar a necessidade de os pesquisadores criarem hipóteses sobre o potencial de um micro-organismo com base na presença de determinados genes, as transcriptômicas de RNA olham a expressão real dos genes regulados. Isso pode oferecer oportunidades de observar vias metabólicas ou a regulação positiva específica de fatores de virulência durante a infecção em comparação com a ausência de infecção. Também pode ser usada para observar resposta do hospedeiro à presença de micro-organismos.

## ESTUDOS DE FERIDAS USANDO O SEQUENCIAMENTO 16S

Foram realizados diversos estudos de feridas que usaram o sequenciamento 16S para definir o microbioma de uma variedade de feridas crônicas sem cicatrização ou feridas infectadas (Tabela 2). Apesar das etiologias diferentes das feridas afetando os membros inferiores, parece que o microbioma não diferiu significativamente. Isso foi destacado por Wolcott et al (2016)<sup>[26]</sup> que utilizou o sequenciamento 16S para analisar a composição de comunidades bacterianas presentes em amostras obtidas de 2.963 pacientes: úlceras crônicas de pé diabético (n = 910), úlceras venosas (n = 916), lesões por pressão (n = 767) e feridas operatórias sem cicatrização (n = 370)<sup>[26]</sup>. Todas as amostras de feridas continham uma proporção alta de espécies de Estafilococo (63% de todas as feridas) e Pseudomonas (25% de todas as feridas), além de alta predominância de bactérias anaeróbicas, que são tradicionalmente consideradas comensais ou flora cutânea. Além disso, Kalan et al (2016) também estimou que até 80% das feridas contém fungos, além das bactérias, e eles contribuem com a formação de biofilmes polimicrobianos nas feridas<sup>[27]</sup>.

**Tabela 2. Estudos de tratamento de feridas usando técnicas de sequenciamento de rRNA 16S. Esta lista não representa todas as referências.**

<b>Etiologia da ferida</b>	<b>Literatura</b>
Úlceras de pé diabético	Johani et al, 2017 <sup>[20]</sup> ; Wolcott et al, 2016 <sup>[26]</sup> ; Kalan et al, 2016 <sup>[27]</sup> ; Smith et al, 2018 <sup>[34]</sup> ; Dowd et al, 2008 <sup>[44,45]</sup> ; Price et al, 2009 <sup>[46]</sup> ; Han et al, 2011 <sup>[47]</sup> ; Rhoads et al, 2012 <sup>[48]</sup> ; Gardner et al, 2013 <sup>[49]</sup> ; Gardiner et al, 2017 <sup>[50]</sup> ; Kalan et al, 2017 <sup>[51]</sup> ; Loesche et al, 2017 <sup>[52]</sup> ; Johani et al, 2018 <sup>[53]</sup> ; Suryaaletha et al, 2018 <sup>[54]</sup> ; Wu et al, 2018 <sup>[55]</sup> ; Malone et al, 2019 <sup>[56]</sup>
Infecção de pé diabético	van Asten et al, 2016 <sup>[57]</sup> ; MacDonald et al, 2017 <sup>[58]</sup> ; Malone et al, 2017 <sup>[59,60]</sup> ; Johani et al, 2018 <sup>[61]</sup> ; Malone et al, 2019 <sup>[62]</sup>
Úlceras venosas	Wolcott et al, 2016 <sup>[26]</sup> ; Dowd et al, 2008 <sup>[44]</sup> ; Price et al, 2009 <sup>[46]</sup> ; Wolcott et al, 2009 <sup>[63]</sup> ; Tuttle et al, 2011 <sup>[64]</sup>
Lesões causadas pela pressão	Wolcott et al, 2016 <sup>[26]</sup>
Hidradenite supurativa	Ring et al, 2017 <sup>[65]</sup> ; 2019 <sup>[66]</sup>
Feridas operatórias sem cicatrização	Wolcott et al, 2016 <sup>[26]</sup>

Feridas crônicas sem cicatrização ou feridas com infecções crônicas possuem comunidades polimicrobianas que existem como biofilmes, o que tem sido uma característica definidora da exploração do microbioma das feridas. Como os biofilmes têm crescimento marcadamente reduzido (e, assim, podem ser difíceis de criar em cultura), uma abordagem de sequenciamento molecular pode contornar essas limitações. Quando combinados com uma análise bioinformática, os dados produzidos podem fornecer uma imagem mais ampla dos micro-organismos envolvidos na causa das infecções crônicas e/ou no atraso da cicatrização da ferida.

### **ESTUDOS DE FERIDAS USANDO A ABORDAGEM DE METAGENOMA (DNA OU RNA)**

Diferente do 16S, o sequenciamento de shotgun (DNA) e a transcriptômica de RNA são desafiadores no âmbito técnico e computacional e exigem bastante experiência em bioinformática para analisar conjuntos de dados robustos. Talvez isso explique por que, até hoje, existem apenas dois estudos que utilizaram o sequenciamento de shotgun (DNA)<sup>[28]</sup> ou transcriptômica de RNA<sup>[29]</sup>. Apesar de evidências falhas, ambos os estudos ofereceram olhares animadores sobre a utilidade potencial da microbiologia baseada em moléculas. Kalan et al (2019) usou uma abordagem de shotgun (DNA) de genoma completo para identificar espécies e diferenças no nível da cepa no microbioma de úlceras de pé diabético<sup>[28]</sup>. Esse estudo eloquente revelou que a variação do nível de cepa de *Staphylococcus aureus* e assinaturas genéticas da formação do biofilme estavam associadas a resultados falhos. Cornforth et al (2018) comparou a transcriptômica de *Pseudomonas aeruginosa* durante a infecção humana com a da *P. aeruginosa* em uma variedade de condições laboratoriais<sup>[29]</sup>. Diversas vias, incluindo o sistema de detecção de quórum primário da bactéria tiveram uma expressão significativamente mais baixa nas infecções humanas do que nas muitas condições laboratoriais. Por outro lado, múltiplos genes conhecidos por conferir resistência antibiótica tiveram uma expressão substancialmente maior na infecção humana do que nas condições laboratoriais, explicando potencialmente porque os ensaios de resistência a antibióticos no laboratório clínico subestimam com frequência a resistência nos pacientes.

### **A OPORTUNIDADE DE REDUZIR O USO EXCESSIVO DE AGENTES ANTIMICROBIANOS NO TRATAMENTO DE FERIDAS**

Os agentes antimicrobianos foram originalmente introduzidos para evitar e tratar a infecção de feridas. O conselho atual de órgãos governamentais, como o Instituto nacional de excelência em saúde e tratamento (NICE) no Reino Unido, declara que a disseminação de infecções precisa de tratamento com antibióticos sistêmicos para eliminar a infecção, além de um tratamento com antissépticos tópicos para reduzir o número de micro-organismos na ferida<sup>[30]</sup>. Embora existam muitas evidências sobre qual antibiótico sistêmico é adequado para a prevenção e o tratamento de infecção<sup>[30]</sup>, o nível atual de evidência para o uso de agentes antimicrobianos tópicos é limitado.



Quando a infecção na ferida é diagnosticada, a administração de antibióticos adequados no início pode evitar que a infecção se espalhe para um tecido mais profundo e, possivelmente, evitar o desenvolvimento de sepse. Isso, junto com a aplicação de agentes/antissépticos antimicrobianos tópicos, pode reduzir a biocarga microbiana o suficiente para permitir que o sistema imune combata os micro-organismos invasores. Isso pode ser considerado relativamente simples para feridas agudas, onde apenas 6% declaradamente contém biofilme e um único organismo tende a infectar as feridas<sup>[31]</sup>. No entanto, é muito mais complicado para feridas crônicas. Aqui, os micro-organismos geralmente são encontrados no biofilme<sup>[14,17,31]</sup> e pode ser difícil estabelecer se um único patógeno oportunista está causando a infecção ou se diversas espécies estão interagindo dentro do biofilme. A administração de um único antibiótico (mesmo se for um agente de amplo espectro) geralmente não erradicará o biofilme ou os organismos potencialmente causadores da infecção excessiva, porque os níveis na área da infecção são insuficientes ou o antibiótico é inativado pelas enzimas acumuladas na matriz do biofilme — produzidas por outras espécies resistentes crescendo junto com o patógeno (resistência associada)<sup>[32]</sup>. Isso leva à necessidade de níveis altos de antibióticos para combater ativamente os micro-organismos dentro do biofilme, o que geralmente resulta em tratamento inadequado.

Nos últimos 70 anos, temos tratado infecções com sucesso, porém, o desenvolvimento da resistência antimicrobiana (RAM) levou à necessidade da administração antimicrobiana para antibióticos e outros agentes microbianos, buscando promover o uso sensato. Desde a introdução da administração antimicrobiana, houve uma redução no uso de antibióticos (4,5% desde 2013)<sup>[33]</sup>, mas ainda há um longo caminho pela frente. Uma pesquisa realizada no Reino Unido por meio da vigilância mostrou que 1 em cada 3 pessoas receberá antibióticos em um ano e em pelo menos 20% desses casos, os antibióticos serão administrados de forma inadequada<sup>[34]</sup>. A administração antimicrobiana tem o potencial de ajudar a reverter a tendência do uso inadequado de antibióticos e evitar o desenvolvimento de RAM, mas ainda há muito a ser feito para incentivar o uso adequado de curativos antimicrobianos e outros produtos para o tratamento de feridas.

#### **A função da administração antimicrobiana no tratamento de feridas de biofilme**

A administração antimicrobiana geralmente é feita por uma equipe ou um comitê.

A responsabilidade deles é fornecer orientação estratégica, aconselhamento, mão de obra, inteligência e recursos para quaisquer atividades relacionadas à administração. É essencial que cada provedor selecione e administre corretamente o antibiótico adequado ao paciente, causando o mínimo de dano a ele, além de proteger outras pessoas do risco de resistência no futuro<sup>[35]</sup>.

Um entendimento maior da fisiologia e da estrutura dos biofilmes levou a uma redução do uso de antibióticos e à introdução do tratamento de feridas de biofilme como um conceito aceito na prática atual<sup>[36]</sup>. A ferida é desbridada, limpa e um curativo antimicrobiano é usado topicamente para reduzir a biocarga e ajudar na cicatrização. Se não houver mudanças na ferida após 2 semanas, deve ser incentivada uma mudança no curativo antimicrobiano, se for considerada adequada. Há um debate sobre se os agentes antimicrobianos devem ser usados durante os procedimentos de desbridamento e limpeza para reduzir o número de micro-organismos ou se a água é suficiente para reduzir a biocarga da ferida<sup>[37]</sup>.

Há poucas orientações definitivas para cada etapa e isso depende mais do nível de treinamento da equipe que realiza o tratamento. A escolha do curativo adequado de acordo com a avaliação varia e é determinada pela orientação local ou pela preferência do médico. Nem sempre estão disponíveis no laboratório as evidências de apoio sobre o status da ferida em termos de infecção/colonização<sup>[1,15,38,39]</sup>.

Atualmente, existem evidências limitadas sobre qual curativo antimicrobiano deve ser usado, ou se um agente demonstrará resultados melhores que outro. Os agentes antimicrobianos incluem mel, iodo, prata e polihexametileno biguanida (PHMB) e estes agentes são incorporados em diversos tipos de curativo. A escolha inicial de curativo depende da estrutura física (ex. alginato, carboximetilcelulose, espuma, gel, hidrocoloide) e dos requisitos da ferida. Então, é o médico que decide se é necessário um antimicrobiano e se ele será incorporado em um curativo ou na forma de creme, óleo ou gel. Infelizmente, muitas das evidências se baseiam em testes laboratoriais que, em geral, não possuem um padrão e dependem do uso de padrões feitos para o mercado têxtil e, portanto, não têm credibilidade.

Portanto, é necessário que o desenvolvimento e a padronização de testes laboratoriais clinicamente relevantes e de fluidos que simulam feridas sejam mais aprofundados. Por exemplo, alguns curativos funcionam permitindo que o agente antimicrobiano entre no leito da ferida, enquanto os outros trabalham dentro da ferida. Os diversos métodos podem ajudar a fornecer evidência *in vitro* para as diferentes afirmações realizadas. Outros padrões são usados para testar as propriedades físicas dos curativos. Desta forma, é muito difícil comprar curativos diferentes. A redução logarítmica de organismos em um determinado período de tempo e o “time to kill” são um método *in vitro* citado e aceito pelas autoridades reguladoras, com base no Método de teste AATCC 100 (2019)<sup>[40]</sup>; no entanto, ele usa organismos planctônicos e não organismos encontrados em biofilmes. Precisaria ser realizado o teste da redução da biocarga ou da remoção do biofilme usando um modelo para refletir o leito da ferida crônica. Foram feitas pesquisas para desenvolver tal modelo, usando um modelo de explante de porco, que demonstrou que havia uma janela terapêutica disponível de 24 horas antes do biofilme ser formado novamente após a ruptura<sup>[41]</sup>.

### **Evitando a resistência antimicrobiana**

O desenvolvimento de um esquema de classificação para curativos avançados, com e sem agentes antimicrobianos, poderia ajudar potencialmente os médicos que lidam com feridas infectadas e não infectadas, quando existem barreiras à cicatrização da ferida. Esta abordagem pode dar apoio à equipe de administração antimicrobiana nas instalações de saúde e fornecer uma orientação melhor sobre o gerenciamento efetivo e o uso adequado, ao invés dos protocolos não comprovados, muitas vezes elaborados pelos provedores de tratamento de feridas.

A administração antimicrobiana de produtos para o tratamento de feridas deveria ser considerada na tomada de decisão clínica, buscando evitar que uma resistência seja desenvolvida futuramente. Existe a necessidade de fornecer conselhos com base em evidências sobre a administração antimicrobiana para que sejam incorporados nas diretrizes locais, a fim de garantir que não seja desenvolvida a resistência a esses antissépticos, como vimos ocorrer com os antibióticos. A administração de antissépticos é considerada sob a área da administração antimicrobiana<sup>[35]</sup>, mas, atualmente a maioria das equipes está focada apenas no uso de antibióticos.

### **Introdução de curativos não medicamentosos para feridas**

Existem curativos modernos que não incorporam um agente antimicrobiano, mas usam propriedades do material do próprio curativo para reduzir os micro-organismos, seja através da retenção do micro-organismo no curativo, longe do leito da ferida (removendo, assim, os organismos quando o curativo é trocado), ou matando os micro-organismos através da interação bioquímica dentro do curativo. Esses curativos podem ter uma função importante na prevenção de infecções pós-operatórias ou como parte do desbridamento e da limpeza a fim de remover as bactérias planctônicas e as células livres<sup>[42]</sup>.

Como resultado da tendência emergente de resistência bacteriana e dos perigos à saúde humana que são, sem dúvida, causados por ela, tem sido feito um grande esforço para desenvolver novos antibióticos que podem vencer as bactérias. No entanto, também foi dito que *“precisamos considerar nossas opções restantes e desenvolver novas opções em um mundo onde não podemos mais contar com os antibióticos para curar infecções. Existem oportunidades não antibióticas para tratar infecções bacterianas graves como opções possíveis”*<sup>[43]</sup>. Além disso, o uso de curativos de feridas que podem erradicar de forma efetiva as bactérias de forma física, sem induzir resistência bacteriana, provaria ser uma adição significativa às opções clínicas de tratamento de feridas, conforme será discutido no próximo artigo deste documento.

## **CONCLUSÃO**

Embora possamos confirmar que os agregados bacterianos/biofilmes estão presentes nas feridas crônicas, sem cicatrização, o papel deles ainda não é evidente. Eles parecem interromper a cicatrização normal das feridas e, por isso, precisam ser gerenciados. Existe um consenso da necessidade da remoção física de descamação e sujidades, em combinação com o tratamento antimicrobiano.

No entanto, o uso de agentes e curativos antimicrobianos deve ser baseado em evidências, ao invés de suposições. O campo do tratamento de feridas deve trabalhar agora para otimizar o uso de antibióticos e antimicrobianos para evitar o uso excessivo deles e implementar a administração antimicrobiana com base em evidência no tratamento de feridas.

## REFERÊNCIAS

1. Coenye T, Goeres D, Van Bambeke F et al. Should standardized susceptibility testing for microbial biofilms be introduced in clinical practice? *Clin Microbiol Infect* 2018; 24(6): 570-2.
2. Stewart PS. Antimicrobial Tolerance in Biofilms. *Microbiol Spectr* 2015; 3(3): MB-0010-2014.
3. International Wound Infection Institute (IWII). *Wound infection in clinical practice*. Wounds International, 2016. Available from: <https://www.woundsinternational.com/resources/details/iwii-wound-infection-clinical-practice> (accessed on 18 December 2019).
4. Costerton JW, Irvin RT, Cheng K-J. The bacterial glycocalyx in nature and disease. *Annu Rev Microbiol* 1981; 35: 299-324.
5. Geesey GG. Microbial exopolymers: Ecological and economic considerations. *ASM News* 1982; 48: 9-14.
6. Wingender J, Neu T, Flemming HC. What are Bacterial Extracellular Polymeric Substances? In: Wingender J, Neu T, Flemming HC, eds. *Microbial Extracellular Polymeric Substances*: Springer Berlin Heidelberg; 1999: 1-19.
7. Mulcahy H, Charron-Mazenod L, Lewenza S. Extracellular DNA chelates cations and induces antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *PLoS Pathog* 2008; 4(11): e1000213.
8. Chiang WC, Nilsson M, Jensen PO et al. Extracellular DNA Shields against Aminoglycosides in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Antimicrob Agents and Chemother* 2013; 57(5): 2352-61.
9. Bjarnsholt T. Silver against *pseudomonas aeruginosa* biofilm. *APMIS* 2007; 115(8): 921-8.
10. de Beer D, Stoodley P, Roe F, Lewandowski Z. Effects of biofilm structures on oxygen distribution and mass transport. *Biotechnol Bioeng* 1994; 43(11): 1131-8.
11. Davies SK, Fearn S, Allsopp LP, et al. Visualizing Antimicrobials in Bacterial Biofilms: Three-Dimensional Biochemical Imaging Using TOF-SIMS. *mSphere* 2017; 2(4): e00211-17.
12. James GA, Zhao AG, Usui M et al. Microsensor and transcriptomic signatures of oxygen depletion in biofilms associated with chronic wounds. *Wound Repair Regen* 2016; 24(2): 373-83.
13. Hogsberg T, Bjarnsholt T, Thomsen JS, Kirketerp-Møller K. Success Rate of Split-Thickness Skin Grafting of Chronic Venous Leg Ulcers Depends on the Presence of *Pseudomonas aeruginosa*: A Retrospective Study. *PLoS One* 2011; 6(5): e20492.
14. Malone M, Bjarnsholt T, McBain A et al. The prevalence of biofilms in chronic wounds: a systematic review and metaanalysis of published data. *J Wound Care* 2017; 26: 20-25.
15. Schultz G, Bjarnsholt T, James GA et al. Consensus guidelines for the identification and treatment of biofilms in chronic nonhealing wounds. *Wound Repair Regen* 2017; 25(5): 744-57.
16. Bay L, Kragh KN, Eickhardt SR et al. Bacterial Aggregates Establish at the Edges of Acute Epidermal Wounds. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 2018; 7(4): 105-13.
17. Bjarnsholt T, Kirketerp-Møller K, Jensen PO et al. Why chronic wounds will not heal: a novel hypothesis. *Wound Repair Regen* 2008; 16(1): 2-10.
18. Fazli M, Bjarnsholt T, Kirketerp-Møller K et al. Non-random Distribution of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* in Chronic Wounds. *J Clin Microbiol* 2009; 47(12): 4084-89.
19. Price LB, Liu CM, Frankel YM et al. Macroscale spatial variation in chronic wound microbiota: a cross-sectional study. *Wound Repair Regen* 2011; 19(1): 80-88.
20. Johani K, Malone M, Jensen S et al. Microscopy visualisation confirms multi-species biofilms are ubiquitous in diabetic foot ulcers. *Int Wound J* 2017; 14(6): 1160-69.
21. Bjarnsholt T, Alhede M, Alhede M et al. The *in vivo* biofilm. *Trends Microbiol* 2013; 21(9): 466-74.
22. Thomsen TR, Aasholm MS, Rudkjøbing VB et al. The bacteriology of chronic venous leg ulcer examined by culture-independent molecular methods. *Wound Repair Regen* 2010; 18(1): 38-49.
23. Clarridge JE 3rd. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin Microbiol Rev* 2004; 17(4): 840-62.
24. Poretsky R, Rodriguez-R LM, Luo C et al. Strengths and Limitations of 16S rRNA Gene Amplicon Sequencing in Revealing Temporal Microbial Community Dynamics. *PLoS One* 2014; 9(4): e93827.
25. Malone M, Gosbell IB, Dickson HG et al. Can molecular DNA-based techniques unravel the truth about diabetic foot infections? *Diabetes Metab Res Rev* 2017; 33(1): e2834.
26. Wolcott RD, Hanson JD, Rees EJ et al. Analysis of the chronic wound microbiota of 2,963 patients by 16S rDNA pyrosequencing. *Wound Repair Regen* 2016; 24(1): 163-74.
27. Kalan L, Loesche M, Hodkinson BP et al. Redefining the Chronic-Wound Microbiome: Fungal Communities Are Prevalent, Dynamic, and Associated with Delayed Healing. *MBio* 2016; 7(5): e01058-16.
28. Kalan LR, Meisel J, Loesche MA et al. Strain- and Species-Level Variation in the Microbiome of Diabetic Wounds Is Associated with Clinical Outcomes and Therapeutic Efficacy. *Cell Host Microbe* 2019; 25(5): 641-55.
29. Cornforth DM, Dees JL, Ibberson CB et al. *Pseudomonas aeruginosa* transcriptome during human infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2018; 115(22): E5125-E5134.
30. National Institute for Health and Care Excellence. *Surgical site infections: prevention and treatment, 2019*. NICE, London, UK. Available from: <https://www.nice.org.uk/guidance/ng125/resources/surgical-site-infections-prevention-and-treatment-pdf-66141660564421> (accessed on 18 December 2019).
31. James GA, Swogger E, Wolcott R et al. Biofilms in chronic wounds. *Wound Repair Regen* 2008; 16: 37-44.
32. Lebeaux D, Ghigo J-M, Beloina C. Biofilm-Related Infections: Bridging the Gap between Clinical Management and Fundamental Aspects of Recalcitrance toward Antibiotics. *Microbiol Mol Biol Rev* 2014; 78: 510-43.
33. Sharland Mand Wilson P. *NICE impact antimicrobial resistance, 2018*. NICE, London, UK. Available from: <https://www.nice.org.uk/Media/Default/About/what-we-do/Into-practice/measuring-uptake/NICEimpact-antimicrobial-resistance.pdf> (accessed on 18 December 2019).
34. Smith DM, Dolk FK, Pouwels KP et al. Defining the appropriateness and inappropriateness of antibiotic prescribing in primary care. *J Antimicrob Chemother* 2018; 73(2): 11-18.
35. British Society for Antimicrobial Chemotherapy. *Antimicrobial Stewardship from Principles to Practice 2018*, Birmingham, United Kingdom. ISBN: 978-178926-984-0.

36. Malone M and Swanson T. Biofilm-based wound care: the importance of debridement in biofilm treatment strategies. *Br J Community Nurs* 2017; 22: S20-S25.
37. Fletcher J and Wolcott R. The role of wound cleansing in the management of wounds. *Wounds Int* 2014; 1(1): 25-30.
38. 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): S1-89.
39. HOiby N, Bjarnsholt T, Moser C et al. ESCMID guideline for the diagnosis and treatment of biofilm infections 2014. *Clin Microbiol Infect* 2015; 21(1): S1-25.
40. American Association of Textile Chemists and Colorists. *TM100-TM100 Test Method for Antibacterial Finishes on Textile Materials: Assess, 2019*. AATCC, North Carolina, USA. Available from: <https://members.aatcc.org/store/tm100/513> (accessed on 18 December 2019).
41. Phillips PL, Yang Q, Schultz GS. The effect of negative pressure wound therapy with periodic instillation using antimicrobial solutions on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm on porcine skin explants. *Int Wound J* 2013; 10(1): 48-55.
42. Rippon MG, Rogers AA, Sellars L et al. Effectiveness of a non-medicated wound dressing on attached and biofilm encased bacteria: laboratory and clinical evidence. *J Wound Care* 2018; 27(3): 146-55.
43. Opal SM. Non-antibiotic treatments for bacterial diseases in an era of progressive antibiotic resistance. *Crit Care* 2016; 20: 397.
44. Dowd S, Sun Y, Secor P et al. Survey of bacterial diversity in chronic wounds using Pyrosequencing, DGGE, and full ribosome shotgun sequencing. *BMC Microbiology* 2008; 8(1): 43.
45. Dowd SE, Wolcott RD, Sun Y et al. Polymicrobial nature of chronic diabetic foot ulcer biofilm infections determined using bacterial tag encoded FLX amplicon pyrosequencing (bTEFAP). *PLoS One* 2008; 3(10): e3326.
46. Price LB, Liu CM, Melendez JH et al. Community analysis of chronic wound bacteria using 16S rRNA gene-based pyrosequencing: impact of diabetes and antibiotics on chronic wound microbiota. *PLoS One* 2009; 4(7): e6462.
47. Han A, Zenilman JM, Melendez JH et al. The importance of a multifaceted approach to characterizing the microbial flora of chronic wounds. *Wound Repair Regen* 2011; 19(5): 532-41.
48. Rhoads DD, Wolcott RD, Sun Y, Dowd SE. Comparison of culture and molecular identification of bacteria in chronic wounds. *Int J of Molecular Sciences* 2012; 13(3): 2535-50.
49. Gardner SE, Hillis SL, Heilmann K et al. The neuropathic diabetic foot ulcer microbiome is associated with clinical factors. *Diabetes* 2013; 62(3): 923-30.
50. Gardiner M, Vicaretti M, Sparks J et al. A longitudinal study of the diabetic skin and wound microbiome. *PeerJ* 2017; 5: e3543.
51. Kalan L, Zhou M, Labbie M et al. Measuring the microbiome of chronic wounds with use of a topical antimicrobial dressing - A feasibility study. *PLoS One* 2017; 12(11): e0187728.
52. Loesche M, Gardner SE, Kalan L et al. Temporal stability in chronic wound microbiota is associated with poor healing. *J Invest Dermatol* 2017; 137(1): 237-44.
53. Johani K, Malone M, Jensen SO et al. Evaluation of short exposure times of antimicrobial wound solutions against microbial biofilms. *From in vitro to in vivo. J Antimicrob Chemother* 2018; 73(2): 494-502.
54. Suryaletha K, John J, Radhakrishnan MP et al. Metataxonomic approach to decipher the polymicrobial burden in diabetic foot ulcer and its biofilm mode of infection. *Int Wound J* 2018; 15: 473-81.
55. Wu M, Li Y, Guo D et al. Microbial Diversity of Chronic Wound and Successful Management of Traditional Chinese Medicine. *Evid Based Complement Alternat Med* 2018: 9463295.
56. Malone M, Schwarzer S, Radzieta M et al. Effect on total microbial load and community composition with two vs six-week topical Cadexomer Iodine for treating chronic biofilm infections in diabetic foot ulcers. *Int Wound J* 2019; 16(6): 1477-86.
57. van Asten SA, La Fontaine J, Peters EJ et al. The microbiome of diabetic foot osteomyelitis. *Eur J Microbiol Infect Dis* 2016; 35(2): 293-98.
58. MacDonald A, Oh I, Grier A et al. Microbiome Analysis for Assessments of Treatment Response and Salvage Prognosis in Infected Diabetic Foot Ulcers. *Foot & Ankle Orthopaedics* 2017; 2(3).
59. Malone M, Johani K, Jensen SO et al. Effect of cadexomer iodine on the microbial load and diversity of chronic non-healing diabetic foot ulcers complicated by biofilm in vivo. *J Antimicrob Chemother* 2017; 72(7): 2093-101.
60. Malone, M, Johani K, Jensen SO et al. Next Generation DNA Sequencing of Tissues from Infected Diabetic Foot Ulcers. *EBioMedicine* 2017; 21: 142-49.
61. Johani K, Fritz BG, Bjarnsholt T et al. Understanding the microbiome of diabetic foot osteomyelitis: insights from molecular and microscopic approaches. *Clin Microbiol Infect* 2018; 25(3): 332-39.
62. Malone M, Fritz BG, Johani K et al. Analysis of proximal "clean" bone margins in diabetic foot osteomyelitis by conventional culture, DNA sequencing and microscopy. *APMIS* 2019; 127(10): 660-70.
63. Wolcott RD, Gontcharova V, Sun Y, Dowd SE. Evaluation of the bacterial diversity among and within individual venous leg ulcers using bacterial tag-encoded FLX and titanium amplicon pyrosequencing and metagenomic approaches. *BMC Microbiol* 2009; 9: 226.
64. Tuttle MS, Mostow E, Mukherjee P et al. Characterization of Bacterial Communities in Venous Insufficiency Wounds by Use of Conventional Culture and Molecular Diagnostic Methods. *J Clin Microbiol* 2011; 49(11): 3812-19.
65. Ring HC, Thorsen J, Saunte DM et al. The Follicular Skin Microbiome in Patients With Hidradenitis Suppurativa and Healthy Controls. *JAMA Dermatol* 2017; 153(9): 897-905.
66. Ring H, Sigsgaard V, Thorsen J et al. The microbiome of tunnels in hidradenitis suppurativa patients. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2019; 33: 1775-80.