



TEMA 2-2021:

Biofilms: ¿enemigos de la cicatrización?

Recibido: 23/04/2019

Aceptado: 10/11/2021

¹ Valeria Tinoco Chavarria

² Eduardo Brenes Leñero

¹ Residente de Cirugía General. Hospital Calderón Guardia, Universidad de Costa Rica.
aletinoco23@gmail.com

² Asistente especialista en Cirugía Plástica, Reconstructiva y Estética. Hospital México.
Caja Costarricense del Seguro social. eduardobrenes@yahoo.com

Resumen

Una herida crónica es aquella que presenta un retraso en la cicatrización. Los biofilms constan de comunidades polimicrobianas que se adhieren a una superficie, interviniendo negativamente en el proceso de la cicatrización cronicándola. En este artículo se describe el efecto fisiopatológico que produce el biofilm en la herida provocando un estado inflamatorio prolongado, la alteración de la respuesta inmune, el retraso de la reepitelización y la disminución del desarrollo de tejido de granulación que provocan retardo en la cicatrización normal de la herida

Abstract:

A chronic wound is a wound that has a delay in healing due to different etiologies. Biofilm consist of polymicrobial communities that adhere to a surface, intervening negatively in the process of wound healing, making it chronic. This article describes the pathophysiological effect produced by biofilm in a prolonged inflammatory state, the alteration of the immune response, the delay in re-epithelization and the decrease in the development of granulation tissue that cause a delay in normal wound healing.

Palabras claves:

heridas; cicatrización; biofilms; crónico; cronicidad

Key words

wound; healing; chronic; chronicity; biofilm

Introducción

En la cicatrización de heridas ocurre un proceso dinámico donde no solo se involucran mediadores químicos, células sanguíneas y parenquimatosas, y proteínas de matriz,(1) si no donde también intervienen de manera importante los microorganismos que se encuentran en el microambiente de la misma.(2)

Se considera que una herida es crónica cuando presenta algún grado de retraso en la cicatrización, evidente como la falta de integridad funcional y anatómica de la piel al mes de producida la lesión.(3, 4) A medida que la población envejece, las heridas crónicas se vuelen más prevalentes y se observan como úlceras diabéticas, úlceras por presión, y úlceras por estasis venosa.(3-5) Estas representan una gran problemática en el sistema de salud a nivel mundial con altas tasas de morbimortalidad y costos de millones de dólares al año.(3) Se cree que una de las causas de su cronicidad es la formación de biofilms.

Múltiples estudios sugieren que además de la hipoxia, la lesión por reperusión y los factores intrínsecos del huésped, los biofilms representan el cuarto pilar en la patología de las heridas que no cicatrizan.(3-6)

Ahora: ¿qué es un biofilm?

Un biofilm se define como una comunidad polimicrobiana de bacterias, hongos, virus u otros factores biogénicos que se adhieren o fijan a una superficie o interfaz, y se encuentran englobados por una matriz extracelular de polisacáridos, proteínas, lípidos, iones y ADN extracelular.(3, 4, 6-18)

La formación del biofilm se divide en cuatro etapas: 1). fijación bacteriana a una superficie o interfaz, 2). crecimiento de colonias, 3). maduración, y 4). desprendimiento.(4, 18)

A medida que se produce la fijación, la expresión proteica del proteoma bacteriano tiene la capacidad de cambiar hasta en un 50%, haciendo que las bacterias dentro del biofilm sean fenotípicamente diferentes a su contraparte planctónica (forma libre).(18)

Una de las principales diferencias es la producción de matriz extracelular, considerado como el elemento distintivo del biofilm. Este proporciona adhesión, agregación y protección a los microorganismos.(4)

Las fases de crecimiento y maduración dependen de la habilidad sinérgica de los microorganismos para trabajar en conjunto mediante una comunicación célula a célula conocida como quorum sensing (QS).(3, 18) El QS está constituido por un sistema de feromonas que modulan la actividad microbiana al orquestar los diferentes componentes del biofilm, permitiéndole actuar como una entidad multicelular compleja.(15, 16)

Finalmente, el desprendimiento se ha atribuido a la erosión. No obstante, mediante visualización directa de microcolonias que se ha evidenciado un desprendimiento espontáneo de células individuales en forma planctónica. (18)

Los biofilms pueden localizarse en casi cualquier parte del cuerpo y su relación con el hospedero varía desde comensal hasta altamente patógeno.(6)

Los biofilms comensales protegen al ser humano de la colonización de microorganismos dañinos. Sin embargo, estos pueden transformarse en patógenos cuando sufren modificaciones genéticas y adquieren mecanismos de virulencia.(9) Así mismo, conforme el biofilm madura, aumenta su resistencia a la respuesta inmune y a la actividad antimicrobiana, en parte debido a su baja tasa metabólica, su naturaleza polimicrobiana y a la transferencia de genes de resistencia en plásmidos que impiden u obstaculizan la efectividad de los antibióticos.(3, 5, 14)

Por otra parte, la matriz extracelular contribuye al capturar radicales libres, evitar la fagocitosis, inhibir la unión de los antibióticos a las bacterias y transportar nutrientes.(3, 18)

El papel de los *biofilms* en la cicatrización

El proceso de cicatrización involucra una respuesta inflamatoria autolimitada que permite preparar el lecho de la herida para su curación. Durante la respuesta inflamatoria, hay una infiltración secuencial de neutrófilos, macrófagos y linfocitos al sitio lesionado.

Los neutrófilos eliminan las bacterias invasoras y los residuos celulares de la herida; seguidamente, son reemplazados por macrófagos y por linfocitos a medida que avanza la inflamación y se eliminan las bacterias.(19) Esta serie de eventos parece estar alterada en heridas

que no cicatrizan donde se evidencia una infiltración continua y excesiva de neutrófilos. Debe haber un estímulo persistente para atraer y reclutar a estos neutrófilos a la herida y el biofilm parece ser el elemento clave. (4, 7, 12, 15)

Los leucocitos normalmente son capaces de eliminar bacterias planctónicas, pero no bacterias en biofilms. (20) Los mecanismos de resistencia del biofilm a la eliminación por leucocitos humanos no han sido descritos a fondo pero se cree que son debido a: 1) penetración limitada de los leucocitos en la matriz extracelular; 2) inactivación o supresión de leucocitos por componentes de la matriz extracelular o del QS; 3) disminución de la capacidad de los leucocitos para fagocitar bacterias en biofilms; 4) alteraciones genéticas que aumentan la tolerancia y resistencia bacteriana. (4, 21, 22)

Los estudios evidencian una gran cantidad de neutrófilos que rodean pero no son capaces de infiltrar los biofilms debido a la protección de la matriz extracelular y diversos factores de virulencia que afectan la actividad de los neutrófilos. (4, 19)

Esta acumulación excesiva de neutrófilos mantiene a la herida detenida en una etapa inflamatoria persistente que perjudica la cicatrización normal y se cree favorece la supervivencia del biofilm, ya que aumenta la permeabilidad capilar con la liberación sostenida de exudado plasmático que aporta nutrientes a los microorganismos. (7)

Fazli et al. (20) investigaron la respuesta inflamatoria celular contra los biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* en las heridas crónicas para evaluar el número de neutrófilos acumulados en el sitio de la infección. El análisis cuantitativo reveló un aumento significativo en el número de neutrófilos, que fue más significativo en el caso de *P. aeruginosa* que de *S. aureus*.

Además de reclutar neutrófilos, se ha visto que los biofilms establecen una compleja relación huésped-microorganismos que favorecen la producción de metaloproteinasas extracelulares y el desbalance de citocinas. (7, 15)

Por ejemplo, *S. aureus* puede atenuar la respuesta inmune al reducir la expresión de citocinas pro-inflamatorias como quimiocina C-X-C ligando 2 (CXCL2), interleucina 1 (IL1), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y quimiocina C-C ligando 2

(CXCL2), interleucina 1 (IL1), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y quimiocina C-C ligando 2 (CCL2) que impiden la invasión de macrófagos. (23) Por otra parte, la respuesta inmune del huésped contra el biofilm estimula la liberación de citocinas pro-inflamatorias y factores de crecimiento como el factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento endotelial, TNF- α , IL-6 y CXCL8/IL-8.

Generalmente, los niveles de TNF- α se elevan en las primeras 24 horas de la lesión para estimular a los queratinocitos, fibroblastos, factores de crecimiento y mecanismos de defensa inmune. (24) En la inflamación crónica los niveles de TNF- α se encuentran persistentemente elevados lo que lleva a una inhibición de la angiogénesis, la proliferación celular y la migración celular y a un aumento de la apoptosis celular. (4, 24, 25)

Evidencia *in vitro*

Con el fin de estudiar el papel del biofilm en la patogénesis de las heridas, se han creado modelos *in vitro*, al simular las características funcionales de biofilms patógenos, permiten su muestreo para su caracterización y subsecuentes análisis experimentales. (15) Por ejemplo, Werthen et al. (26) crearon un modelo con gel de colágeno y proteínas séricas (imita el lecho de las heridas crónicas) para el crecimiento de *S. aureus* y *P. aeruginosa* que alcanzó características distintivas de biofilms como el establecimiento de una matriz de polisacáridos y la mayor tolerancia a los antibióticos.

Hill et al. (27) también emplearon un modelo *in vitro* para demostrar que los cultivos de biofilms presentan una mayor tolerancia antibiótica que sus contrapartes planctónicas. El modelo Lubbock Chronic Wound Biofilm (LCWB) se diseñó para evaluar biofilms multiespecie que simulan mejor la carga biológica de heridas crónicas. Utilizando este modelo, Dowd et al. (28) evidenciaron que distintos tratamientos pueden dirigirse a poblaciones específicas dentro de un mismo biofilm. Kirker et al. (29) crearon co-cultivos *in vitro* de biofilms de *S. aureus* y queratinocitos humanos (QH) y demostraron que luego de 3 horas de exposición al biofilm, los QH mostraron una viabilidad reducida y a las 9 horas hubo un aumento en la apoptosis. Adicionalmente, a las 24 horas los HK expuestos tanto a biofilms como a bacterias planctónicas, mostraron un cierre reducido en la herida.

Las bacterias anaerobias suelen ser las especies predominantes en las heridas crónicas de las úlceras del pie diabético, las úlceras venosas y las infecciones del sitio quirúrgico, y contribuyen a la patogenicidad en dichos biofilms.(30, 31) Por esta razón, Sun et al.(31) utilizaron un modelo LCWB que incorporó anaerobios, *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM), *Enterococcus faecalis* resistente a la vancomicina y *P. aeruginosa* y demostraron que las bacterias anaerobias pueden proliferar en el biofilm bajo condiciones aeróbicas, y logran además establecer una relación sinérgica con las bacterias aerobias dentro del biofilm. Stephens et al.(32) estudiaron el efecto de los anaerobios aislados de úlceras venosas sobre la proteólisis de la matriz extracelular y la curación de heridas *in vitro*. Determinaron que a altas concentraciones *Peptostreptococcus* spp. logró inhibir tanto la proliferación de fibroblastos como de queratinocitos y a menores concentraciones la proliferación de queratinocitos y del endotelio.

Evidencia *in vivo*

A inicios de los años 1990s surgió la primera evidencia del crecimiento de biofilms en heridas de animales(9). A partir de entonces los modelos de heridas porcinas, murinas y de conejo han ganado popularidad, dada la producción similar de macrófagos, neutrófilos, enzimas inflamatorias y queratinocitos con respecto a heridas en humanos, permitiendo comprender mejor la fisiopatología de la cicatrización.(8) Uno de los estudios iniciales, realizado en 1996 por Akiyama et al.(33), demostró no solo la capacidad de *S. aureus* de formar colonias bacterianas en heridas de ratones, sino la presencia de polimorfonucleares y macrófagos limitados a la periferia de las colonias. Además, con la microscopía electrónica se evidenció la presencia de exopolisacáridos (EPS) de matriz extracelular en forma de estructuras fibrilares alrededor de las células de *S. aureus* y luego en forma de membranas positivas con la tinción de rojo de rutenio. Serralta et al.(34) diseñaron un estudio para evaluar la formación de biofilms en heridas de espesor parcial en cerdos. Las heridas se inocularon con *P. aeruginosa* y se les realizó una tinción con rojo congo que reveló una matriz de EPS rodeando las bacterias, indicando la presencia de biofilms en heridas. Davis et al.(35) de igual manera utilizaron un modelo de herida porcino para estudiar la habilidad del *S. aureus* de formar biofilms *in vivo*. Demostraron que el antibiótico tópico fue efectivo contra el *S. aureus* planctónico, pero no así contra el

S. aureus dentro de biofilms. Roche et al.(36) utilizaron un modelo de heridas murinas de espesor parcial colonizadas por SARM. A las 24 horas de inoculación se evidenció la presencia de un biofilm denso en la superficie de la herida. Además se demostró que antimicrobianos tópicos comunes tuvieron una eficacia reducida cuando el tratamiento se inició 24 horas después de la inoculación.

Múltiples estudios sugieren que el QS desempeña un papel importante en la formación y maduración de biofilms. Davis et al.(37) determinaron que cepas mutantes de *P. aeruginosa* deficientes en QS formaron biofilms desestructurados, con un espesor de solo el 20%, y sensibles a la eliminación con detergentes, al compararlos con biofilms de cepas salvajes productoras de QS. Adicionalmente, al agregar cepas salvajes a los biofilms de cepas mutantes, estos fueron capaces de adquirir mayor grosor, estructura y resistencia a la eliminación. Rashid et al.(38) descubrieron, mediante un modelo de quemadura murina, que una inactivación genética en el gen de la polifosfato quinasa (PPK) hace que *P. aeruginosa* sea incapaz de formar un biofilm maduro por afectación de las moléculas del QS, reducción de la elastasa y reducción de los ramnolípidos. Nakagami et al.(39) inocularon cepas mutantes de *P. aeruginosa* incapaces de inducir factores de virulencia dependientes del QS en una úlcera por presión en ratas. Las respuestas inflamatorias y el número de bacterias no difirieron entre cepas mutantes y el control. Sin embargo, biofilms inmaduros definidos por la ausencia de agregados bacterianos densos y EPS, se produjeron en cepas deficientes de QS. Otro estudio realizado por Roche et al.(40) utilizó una cepa de SARM aislada de una herida porcina sin cicatrizar y la inoculó nuevamente en heridas porcinas sanas. Las infecciones resultantes mostraron una mayor carga biológica con biofilms más extensos y numerosos que los observados en los estudios con la cepa original. Además, las heridas infectadas con la cepa hija experimentaron un mayor retraso en la cicatrización en términos del área y el porcentaje de cierre de la herida. en la herida.

Schaber et al.(41) plantearon que el QS no era determinante para la formación de biofilms *in vivo* de *P. aeruginosa* y para comprobarlo utilizaron cepas salvajes y cepas mutantes deficientes en QS. Ambas cepas desarrollaron un número similar de unidades formadoras de colonias a las 8, 24 y 46 horas y la estructuración del biofilm se conservó en ambos casos. Sin embargo, las

cepas mutantes resultaron menos virulentas al producir menor bacteriemia y menor tamaño de la herida.

Schierle et al.(13) emplearon un modelo murino para demostrar que la inoculación de *S. aureus* o *S. epidermidis* en heridas resultó en el establecimiento de un biofilm y en la alteración de la reepitelización normal manifestada por una brecha epitelial significativamente mayor en las heridas infectadas.

Gurjala et al.(6) crearon heridas por punción dérmica en las orejas de conejos. Posteriormente se les inoculó *S. aureus* y se observó la formación de biofilms dentro de las 24 horas posteriores. La medición de los marcadores séricos confirmó que el biofilm logró crear una respuesta inflamatoria que perjudicó la migración epitelial, el crecimiento del tejido de granulación y por ende la cicatrización de las heridas.

Zhao et al.(42) en el año 2012 y posteriormente Watters et al.(43) en el 2013 desarrollaron un modelo de herida en ratones diabéticos inoculando de *P. aeruginosa*. Encontraron que las heridas tardaron más en cicatrizar con un retraso promedio de 2 semanas en comparación con el control.(42, 43) Además, las características histológicas fueron similares a las heridas crónicas en humanos, presentando un epitelio hiperproliferativo, crecimiento vascular en el centro de las heridas e infiltración de células inflamatorias.(42) Adicionalmente, se determinó que la prevalencia del biofilm de *P. aeruginosa* aumentó cuando los ratones fueron tratados con insulina, lo que sugiere que el entorno en la herida diabética puede contribuir a la formación de un biofilm.(43) Otro estudio realizado en ratones diabéticos con biofilms de *S. aureus* por Nguyen et al.(44) demostró que las heridas tenían significativamente menos TLR 2, TLR 4, interleucina-1 β y expresión del factor de necrosis tumoral α que las heridas en ratones no diabéticos. Ambos grupos tuvieron una carga bacteriana e infiltración de neutrófilos similar a los 3 días, pero las heridas diabéticas tuvieron significativamente menos actividad de estallido oxidativo.

La mayoría de investigaciones se han centrado en biofilms formados por una sola especie; sin embargo, como previamente se mencionó, la evidencia indica que los biofilms suelen ser polimicrobianos.(45) Por esta razón, Dalton et al.(46) en el año 2011 diseñaron un modelo de herida murina infectada con un biofilm

polimicrobiano conformado por bacterias gram negativas y gram positivas, así como anaerobias y aerobias, y determinaron que los ratones con heridas que recibieron biofilms multiespecie mostraron un mayor deterioro en la cicatrización en comparación con ratones infectados con una sola especie bacteriana. Además, las bacterias en biofilms polimicrobianos mostraron una mayor resistencia a los antimicrobianos. Seth et al.(45) también comprobaron, utilizando un modelo de una herida inoculada con *S. aureus* y *P. aeruginosa* en un conejo, que los biofilms de especies mixtas establecen una relación sinérgica, con un mayor impacto en la dinámica de la curación de heridas y mayor expresión de IL-1b polimicrobiano conformado por bacterias gram negativas y gram positivas, así como anaerobias y aerobias, y determinaron que los ratones con heridas que recibieron biofilms multiespecie mostraron un mayor deterioro en la cicatrización en comparación con ratones infectados con una sola especie bacteriana. Además, las bacterias en biofilms polimicrobianos mostraron una mayor resistencia a los antimicrobianos. Seth et al.(45) también comprobaron, utilizando un modelo de una herida inoculada con *S. aureus* y *P. aeruginosa* en un conejo, que los biofilms de especies mixtas establecen una relación sinérgica, con un mayor impacto en la dinámica de la curación de heridas y mayor expresión de IL-1b y TNF-a que sus contrapartes monoespecies. Además, plantearon que la mayor virulencia del biofilm polibacteriano depende de la combinación de la patogenicidad de cada especie, verificada utilizando una cepa mutante. Del mismo modo, un estudio reciente de Pastar et al. y TNF-a que sus contrapartes monoespecies. Además, plantearon que la mayor virulencia del biofilm polibacteriano depende de la combinación de la patogenicidad de cada especie, verificada utilizando una cepa mutante. Del mismo modo, un estudio reciente de Pastar et al. (47) demostró los efectos sinérgicos de los biofilms de SARM y *P. aeruginosa* para retrasar la repitelización en heridas porcinas por la supresión del factor de crecimiento de queratinocitos. Además, en presencia de *P. aeruginosa*, SARM expresó factores de virulencia tipo leucocidina de Pantón-Valentine y α -hemolisina. Estos datos sugieren que las interacciones sinérgicas entre diferentes especies bacterianas en los biofilms pueden contribuir a retrasos en la cicatrización y mayor tolerancia antibiótica.

Evidencia en humanos

Los estudios en humanos son escasos, sin embargo se han identificado biofilms en heridas cutáneas. Por ejemplo, James et al.(48) analizaron heridas en pacientes mayores de 18 años y caracterizaron los microorganismos encontrados en dichas heridas. De las 50 muestras de heridas crónicas evaluadas mediante microscopía, 30 se caracterizaron por contener biofilm (60%), mientras que solo una de las 16 heridas agudas evidenció la presencia de biofilm (6%). Los análisis moleculares revelaron comunidades polimicrobianas, incluyendo bacterias estrictamente anaeróbicas, no reveladas por el cultivo. La mayor prevalencia de biofilms en muestras de heridas crónicas en este estudio proporciona evidencia de que los biofilms pueden retrasar la cicatrización de heridas.

Kirketerp-Moller et al.(49) examinaron muestras de heridas de 22 pacientes y detectaron la presencia de *P. aeruginosa* dentro de las muestras de tejido, agregadas como microcolonias alojadas en Alginato.

Neut et al.(50) estudiaron dos casos de pacientes diabéticos con úlceras no cicatrizadas. El análisis microscópico en ambos casos destacó colonias densamente agregadas de bacterias viables rodeadas de EPS y desechos celulares.

Otro estudio realizado por Han et al.(51) demostró, utilizando métodos de detección avanzados, la alta diversidad microbiana en las heridas crónicas y por microscopía reveló la presencia de biofilms confluentes, gruesos y altamente organizados. También midieron las moléculas de QS y determinaron la presencia de patrones de señalización entre las bacterias de los biofilms.

Conclusión

Los estudios *in vitro* e *in vivo* presentan evidencia clínica y científica de la presencia de biofilms, en su mayoría de cepas de *Staphylococcus* y *Pseudomonas*, en las heridas cutáneas. Estos infligen una serie de efectos adversos en el huésped que interfieren con la cicatrización; entre ellos se encuentran el estado inflamatorio prolongado, la alteración de la respuesta inmune, el retraso de la reepitelización y la disminución del desarrollo de tejido de granulación.

El QS es considerando el componente integral de la regulación genética bacteriana en los biofilms. Diversos estudios sugieren un papel protagónico del QS en el desarrollo de biofilms maduros, definidos por agregados bacterianos densos y estructurados en presencia de EPS. Sin embargo, la investigación del QS es muy

reciente y es necesario ampliar los estudios para comprenderlo a fondo.

Se ha demostrado que los biofilms polimicrobianos son más prevalentes y parecen ser más patógenas que las biopelículas especie-específicas en las heridas crónicas. Se cree que esto es debido a la interacción sinérgica de los diferentes microorganismos dentro del biofilm que contribuyen a su virulencia y tolerancia antimicrobiana.

Bibliografía

1. Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med.* 1999;341(10):738-46.
2. Scalise A, Bianchi A, Tartaglione C, Bolletta E, Pierangeli M, Torresetti M, et al. Microenvironment and microbiology of skin wounds: the role of bacterial biofilms and related factors. *Semin Vasc Surg.* 2015;28(3-4):151-9.
3. Clinton A, Carter T. Chronic Wound Biofilms: Pathogenesis and Potential Therapies. *Lab Med.* 2015;46(4):277-84.
4. Wu YK, Cheng NC, Cheng CM. Biofilms in Chronic Wounds: Pathogenesis and Diagnosis. *Trends Biotechnol.* 2018.
5. Kim PJ, Steinberg JS. Wound care: biofilm and its impact on the latest treatment modalities for ulcerations of the diabetic foot. *Semin Vasc Surg.*
6. Gurjala AN, Geringer MR, Seth AK, Hong SJ, Smeltzer MS, Galiano RD, et al. Development of a novel, highly quantitative *in vivo* model for the study of biofilm-impaired cutaneous wound healing. *Wound Repair Regen.* 2011;19(3):400-10.
7. Wolcott RD, Rhoads DD, Bennett ME, Wolcott BM, Gogokhia L, Costerton JW, et al. Chronic wounds and the medical biofilm paradigm. *J Wound Care.* 2010;19(2):45-6, 8-50, 2-3.
8. Metcalf DG, Bowler PG. Biofilm delays wound healing: A review of the evidence. *Burns Trauma.* 2013;1(1):5-12.
9. Percival SL, McCarty SM, Lipsky B. Biofilms and Wounds: An Overview of the Evidence. *Adv Wound Care (New Rochelle).* 2015;4(7):373-81.
10. Martin JM, Zenilman JM, Lazarus GS. Molecular microbiology: new dimensions for cutaneous biology and wound healing.

J Invest Dermatol. 2010;130(1):38-48.

- 11.** Hurlow J, Bowler PG. Potential implications of biofilm in chronic wounds: a case series. *J Wound Care.* 2012;21(3):109-10, 12, 14 passim.
- 12.** Wolcott R, Dowd S. The role of biofilms: are we hitting the right target? *Plast Reconstr Surg.* 2011;127 Suppl 1:28s-35s.
- 13.** Schierle CF, De la Garza M, Mustoe TA, Galiano RD. Staphylococcal biofilms impair wound healing by delaying reepithelialization in a murine cutaneous wound model. *Wound Repair Regen.* 2009;17(3):354-9.
- 14.** Percival SL, Suleman L. Slough and biofilm: removal of barriers to wound healing by desloughing. *J Wound Care.* 2015;24(11):498, 500-3, 6-10.
- 15.** Percival SL, Hill KE, Williams DW, Hooper SJ, Thomas DW, Costerton JW. A review of the scientific evidence for biofilms in wounds. *Wound Repair Regen.* 2012;20(5):647-57.
- 16.** Rajpaul K. Biofilm in wound care. *Br J Community Nurs.* 2015;Suppl Wound Care:S6, s8, s10-1.
- 17.** Thomson CH. Biofilms: do they affect wound healing? *Int Wound J.* 2011;8(1):63-7.
- 18.** Black CE, Costerton JW. Current concepts regarding the effect of wound microbial ecology and biofilms on wound healing. *Surg Clin North Am.* 2010;90(6):1147-60.
- 19.** Martin P, Leibovich SJ. Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly. *Trends Cell Biol.* 2005;15(11):599-607.
- 20.** Fazli M, Bjarnsholt T, Kirketerp-Moller K, Jorgensen A, Andersen CB, Givskov M, et al. Quantitative analysis of the cellular inflammatory response against biofilm bacteria in chronic wounds. *Wound Repair Regen.* 2011;19(3):387-91.
- 21.** Leid JG, Willson CJ, Shirtliff ME, Hassett DJ, Parsek MR, Jeffers AK. The exopolysaccharide alginate protects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria from IFN-gamma-mediated macrophage killing. *J Immunol.* 2005;175(11):7512-8.
- 22.** Bjarnsholt T, Jensen PO, Burmolle M, Hentzer M, Haagensen JA, Hougen HP, et al. *Pseudomonas aeruginosa* tolerance to tobramycin, hydrogen peroxide and polymorphonuclear leukocytes is quorum-sensing dependent. *Microbiology.* 2005;151(Pt 2):373-83.
- 23.** Thurlow LR, Hanke ML, Fritz T, Angle A, Aldrich A, Williams SH, et al. Staphylococcus aureus biofilms prevent macrophage phagocytosis and attenuate inflammation in vivo. *J Immunol.* 2011;186(11):6585-96.
- 24.** Ashcroft GS, Jeong MJ, Ashworth JJ, Hardman M, Jin W, Moutsopoulos N, et al. Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) is a therapeutic target for impaired cutaneous wound healing. *Wound Repair Regen.* 2012;20(1):38-49.
- 25.** Xu F, Zhang C, Graves DT. Abnormal cell responses and role of TNF-alpha in impaired diabetic wound healing. *Biomed Res Int.* 2013;2013:754802.
- 26.** Werthen M, Henriksson L, Jensen PO, Sternberg C, Givskov M, Bjarnsholt T. An in vitro model of bacterial infections in wounds and other soft tissues. *Apmis.* 2010;118(2):156-64.
- 27.** Hill KE, Malic S, McKee R, Rennison T, Harding KG, Williams DW, et al. An in vitro model of chronic wound biofilms to test wound dressings and assess antimicrobial susceptibilities. *J Antimicrob Chemother.* 2010;65(6):1195-206.
- 28.** Dowd SE, Sun Y, Smith E, Kennedy JP, Jones CE, Wolcott R. Effects of biofilm treatments on the multi-species Lubbock chronic wound biofilm model. *J Wound Care.* 2009;18(12):508, 10-12.
- 29.** Kirker KR, Secor PR, James GA, Fleckman P, Olerud JE, Stewart PS. Loss of viability and induction of apoptosis in human keratinocytes exposed to *Staphylococcus aureus* biofilms in vitro. *Wound Repair Regen.* 2009;17(5):690-9.
- 30.** Wolcott RD, Rhoads DD, Dowd SE. Biofilms and chronic wound inflammation. *J Wound Care.* 2008;17(8):333-41.
- 31.** Sun Y, Smith E, Wolcott R, Dowd SE. Propagation of anaerobic bacteria within an aerobic multi-species chronic wound biofilm model. *J Wound Care.* 2009;18(10):426-31.
- 32.** Stephens P, Wall IB, Wilson MJ, Hill KE, Davies CE, Hill CM, et al. Anaerobic cocci populating the deep tissues of chronic wounds impair cellular wound healing responses in vitro. *Br J Dermatol.* 2003;148(3):456-66.
- 33.** Akiyama H, Kanzaki H, Tada J, Arata J. Sta-

phyllococcus aureus infection on cut wounds in the mouse skin: experimental staphylococcal botryomycosis. *J Dermatol Sci*. 1996;11(3):234-8.

34. Serralta VW. Lifestyles of Bacteria in Wounds: Presence of Biofilms? . In: Harrison-Balestra C, editor.: Wounds; 2001. p. 29-34.

35. Davis SC, Ricotti C, Cazzaniga A, Welsh E, Eaglstein WH, Mertz PM. Microscopic and physiologic evidence for biofilm-associated wound colonization in vivo. *Wound Repair Regen*. 2008;16(1):23-9.

36. Roche ED, Renick PJ, Tetens SP, Carson DL. A model for evaluating topical antimicrobial efficacy against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms in superficial murine wounds. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(8):4508-10.

37. Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, Iglewski BH, Costerton JW, Greenberg EP. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science*. 1998;280(5361):295-8.

38. Rashid MH, Rumbaugh K, Passador L, Davies DG, Hamood AN, Iglewski BH, et al. Polyphosphate kinase is essential for biofilm development, quorum sensing, and virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(17):9636-41.

39. Nakagami G, Morohoshi T, Ikeda T, Ohta Y, Sagara H, Huang L, et al. Contribution of quorum sensing to the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* in pressure ulcer infection in rats. *Wound Repair Regen*. 2011;19(2):214-22.

40. Roche ED, Renick PJ, Tetens SP, Ramsay SJ, Daniels EQ, Carson DL. Increasing the presence of biofilm and healing delay in a porcine model of MRSA-infected wounds. *Wound Repair Regen*. 2012;20(4):537-43.

41. Schaber JA, Triffo WJ, Suh SJ, Oliver JW, Haster MC, Griswold JA, et al. *Pseudomonas aeruginosa* forms biofilms in acute infection independent of cell-to-cell signaling. *Infect Immun*. 2007;75(8):3715-21.

42. Zhao G, Usui ML, Underwood RA, Singh PK, James GA, Stewart PS, et al. Time course study of delayed wound healing in a biofilm-challenged diabetic mouse model. *Wound Repair Regen*. 2012;20(3):342-52.

43. Watters C, DeLeon K, Trivedi U, Griswold JA, Lyte M, Hampel KJ, et al. *Pseudomonas aeruginosa*

biofilms perturb wound resolution and antibiotic tolerance in diabetic mice. *Med Microbiol Immunol*. 2013;202(2):131-41.

44. Nguyen KT, Seth AK, Hong SJ, Geringer MR, Xie P, Leung KP, et al. Deficient cytokine expression and neutrophil oxidative burst contribute to impaired cutaneous wound healing in diabetic, biofilm-containing chronic wounds. *Wound Repair Regen*. 2013;21(6):833-41.

45. Seth AK, Geringer MR, Hong SJ, Leung KP, Galiano RD, Mustoe TA. Comparative analysis of single-species and polybacterial wound biofilms using a quantitative, in vivo, rabbit ear model. *PLoS One*. 2012;7(8):e42897.

46. Dalton T, Dowd SE, Wolcott RD, Sun Y, Watters C, Griswold JA, et al. An in vivo polymicrobial biofilm wound infection model to study interspecies interactions. *PLoS One*. 2011;6(11):e27317.

47. Pastar I, Nusbaum AG, Gil J, Patel SB, Chen J, Valdes J, et al. Interactions of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* USA300 and *Pseudomonas aeruginosa* in polymicrobial wound infection. *PLoS One*. 2013;8(2):e56846.

48. James GA, Swogger E, Wolcott R, Pulcini E, Secor P, Sestrich J, et al. Biofilms in chronic wounds. *Wound Repair Regen*. 2008;16(1):37-44.

49. Kirketerp-Moller K, Jensen PO, Fazli M, Madsen KG, Pedersen J, Moser C, et al. Distribution, organization, and ecology of bacteria in chronic wounds. *J Clin Microbiol*. 2008;46(8):2717-22.

50. Neut D, Tijdens-Creusen EJ, Bulstra SK, van der Mei HC, Busscher HJ. Biofilms in chronic diabetic foot ulcers--a study of 2 cases. *Acta Orthop*. 2011;82(3):383-5.

51. Han A, Zenilman JM, Melendez JH, Shirtliff ME, Agostinho A, James G, et al. The importance of a multifaceted approach to characterizing the microbial flora of chronic wounds. *Wound Repair Regen*. 2011;19(5):532-41.