



Original

Estudio in vitro de las propiedades antimicrobianas de una espuma de poliuretano que libera iones de plata

José Miguel Sahuquillo Arce^{a,*}, Agustín Iranzo Tatay^a, Martín Llácer Luna^b,
Yovana Sanchis Boix^b, Jorge Guitán Deltell^a, Eva González Barberá^a,
Joycelyna Beltrán Heras^a y Miguel Gobernado Serrano^a

^aServicio de Microbiología, Hospital La Fe, Valencia, España

^bSección Laboratorio, Centro de Salud Pública de Valencia, Valencia, España

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 23 de septiembre de 2010

Aceptado el 28 de febrero de 2011

On-line el 4 de mayo de 2011

Palabras clave:

Antimicrobiano

Plata

Tratamiento de heridas

Citotoxicidad

RESUMEN

Objetivos: Evaluar las propiedades antimicrobianas de una espuma de poliuretano que libera iones de plata sobre diversos microorganismos. Se estudia la difusión al medio de Ag⁺, así como la posible citotoxicidad sobre células humanas.

Material y métodos: Estudio de liberación de plata de V.A.C. GranuFoam Silver[®] mediante espectrometría de masas (*Inductively Coupled Plasma Mass*). Estudio experimental *in vitro* para evaluar la capacidad bactericida mediante curvas de letalidad sobre *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *S. maltophilia*, *K. pneumoniae*, *E. coli*, *P. mirabilis*, *S. aureus* resistente a meticilina, *E. faecium*, *S. pyogenes* y *C. minutissimum*. Estudio de citotoxicidad sobre fibroblastos humanos.

Resultados: La liberación de Ag⁺ muestra una curva exponencial con una fase estable de meseta a partir de las 3 h, con niveles de 0,22-0,24 mg/l. En 3 h se logró una reducción superior al 99,9% en todos los gramnegativos excepto en *E. coli* que fue del 92,5%. La reducción fue superior al 99% a las 2 h en *S. pyogenes* y *C. minutissimum*, a las 6 h en *S. aureus* y a las 14 h en *E. faecium*. En simulación *in vivo* estas reducciones se alcanzaron en 6 h en los gramnegativos y en 24 h en los grampositivos. Las concentraciones de Ag⁺ no fueron citotóxicas sobre fibroblastos humanos, sin observar diferencias entre las células expuestas a Ag⁺ y los controles ($p = 0,7$).

Conclusión: V.A.C. Granufoam Silver[®] liberó concentraciones bactericidas de Ag⁺ que no fueron perjudiciales para los fibroblastos humanos. Se presenta como una buena alternativa para el control y prevención local de las infecciones.

© 2010 AEC. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

In vitro study of the antimicrobial properties of a silver ion-releasing polyurethane foam

ABSTRACT

Introduction: The antimicrobial properties of a silver ion (Ag⁺)-releasing polyurethane foam were evaluated using different microorganisms. The diffusion of Ag⁺ from the medium, as well as any possible cytotoxicity on human cells, was also studied.

Keywords:

Antimicrobial

Silver

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: wadjur@hotmail.com (J.M. Sahuquillo Arce).

0009-739X/\$ - see front matter © 2010 AEC. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

doi:10.1016/j.ciresp.2011.02.015

Wound treatment
Cytotoxicity

Material and methods: Silver release from V.A.C. GranuFoam Silver[®] was assessed by using inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). An in vitro experimental study was designed to evaluate the bactericide capacity using lethal dose curves on *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *S. maltophilia*, *K. pneumoniae*, *E. coli*, *P. mirabilis*, methicillin resistant *S. aureus*, *E. faecium*, *S. pyogenes* and *C. minutissimum*. A cytotoxicity study was also performed on human fibroblasts.

Results: The silver release showed an exponential curve with a stable meseta phase after 3 hours, with levels of 0.22-0.24 mg/l. A reduction of 99.9% of all the gram-negatives was achieved at 3 hours. The reduction was greater than 99% at 2 hours in *S. pyogenes* and *C. minutissimum*, at 6 h in *S. aureus* and at 14 h in *E. faecium*. In an in vivo simulation model, these reductions were achieved in 6 hours in the gram negatives and 24 h in the gram positives. The silver concentrations were no cytotoxic to human fibroblasts, with no differences being observed between the cells exposed to Ag⁺ and the controls (p = .7)

Conclusion: V.A.C. Granufoam Silver[®] releases bactericide concentrations of Ag⁺ that did not damage human fibroblasts. It appears to be a good alternative for the control and prevention of local infections.

© 2010 AEC. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

El uso de plata con fines antimicrobianos es conocido desde la antigüedad. Heródoto describió como las tropas de Ciro conservaban el agua en jarras de plata para evitar que se corrompiera durante las campañas militares¹, y los romanos echaban monedas de plata en las copas de agua como desinfectante².

Actualmente, el creciente número de microorganismos multiresistentes hace necesario que se busquen alternativas a los tratamientos antimicrobianos habituales, especialmente en el campo del tratamiento y la profilaxis infecciosa tópicos. El uso de materiales con plata puede representar una de las soluciones, y pese a la aparición en los últimos 30 años de apósitos o catéteres capaces de liberar plata, los estudios realizados tienden a confundir al médico respecto a su uso²⁻⁵. Estos nuevos materiales pueden tener una gran repercusión en la salud del paciente al evitarle infecciones que compliquen su cuadro clínico, así como en el control de las resistencias a antimicrobianos, haciendo innecesario un consumo excesivo de estos al impedir infecciones por microorganismos que en algunas unidades suponen un reto terapéutico por sus múltiples resistencias.

El objetivo de este trabajo es evaluar las propiedades antimicrobianas de una espuma de poliuretano con un nuevo sistema de liberación de iones de plata sobre diversos microorganismos multiresistentes, o cuya presencia en una herida puede significar un peligro para la misma. Conjuntamente se estudia la difusión al medio de Ag⁺, así como la posible citotoxicidad sobre células humanas.

Material y métodos

Estudio experimental in vitro para evaluar la capacidad bactericida de V.A.C. GranuFoam Silver[®].

Microorganismos

Los microorganismos utilizados en este estudio procedían de muestras clínicas y fueron los siguientes para el estudio en Phosphate Buffered Saline (PBS): *Acinetobacter baumannii* (*A. baumannii*) sensible sólo a colistina, *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) sensible sólo a colistina, *Stenotrophomonas maltophilia* (*S. maltophilia*) sensible sólo a cotrimoxazol, *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) productora de carbapenemasa (metalobetalactamasa), *Escherichia coli* (*E. coli*) productor de una betalactamasa tipo TEM resistente a inhibidores de betalactamasas (IRT), *Proteus mirabilis* (*P. mirabilis*), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) resistente a meticilina, *Enterococcus faecium* (*E. faecium*), *Streptococcus pyogenes* (*S. pyogenes*) y *Corynebacterium minutissimum* (*C. pyogenes*).

Para el estudio de simulación in vivo se emplearon microorganismos de las mismas especies, excepto *S. pyogenes* y *C. minutissimum*.

Se utilizaron colonias incubadas durante 18 horas a 36 °C en agar sangre.

Estudio de letalidad

Se realizaron curvas de letalidad de V.A.C. Granufoam Silver[®] introduciendo una muestra del producto de 3,2 cm × 2 cm × 0,5 cm (0,100 g, IC 95% 0,09-0,11) en 25 ml de PBS con una concentración mínima del microorganismo a estudio de 10⁵ unidades formadoras de colonias (UFC)/ml, y con Minimum Essential Medium Eagle con 10% de suero bovino fetal (MEM10) y una concentración del microorganismo alrededor de 10⁷ UFC/ml. Fueron incubados en agitación a 36 °C y se tomaron alícuotas de 100 µl para el recuento de microorganismos supervivientes cada hora en el caso de los gramnegativos, cada dos horas en el estudio de los grampositivos en PBS y cada 6 horas en el estudio de los grampositivos en MEM. Las alícuotas se sembraron en agar sangre y se hizo el recuento de colonias tras 48 horas de incubación a 36 °C.

Como control de crecimiento se usó 25 ml de PBS o MEM10 con idéntica concentración de microorganismos y se hizo recuento de los microorganismos supervivientes.

El estudio se repitió tres veces en días diferentes con las mismas condiciones, y el límite de detección de microorganismos supervivientes fue ≥ 100 UFC/ml.

Estudio de simulación in vivo

Se emplearon aislados de las mismas especies del estudio de letalidad con MEM10, y con las mismas condiciones de concentración de inóculo e incubación, tomando alícuotas de 100 μ l cada hora en el caso de los gramnegativos, y cada cinco en el caso de los grampositivos, y se sembraron en cuatro gotas de 25 μ l sin extender en agar Müller-Hinton. El recuento se hizo de manera semicuantitativa tras una incubación de 24 h a 36 °C, anotando el crecimiento como abundante, moderado, escaso o nulo.

Estudio de subpoblaciones por debajo del límite de detección

Una vez obtenidos los resultados, el experimento en PBS se repitió dos veces con la diferencia de que se tomaron alícuotas de 1 ml en lugar de 100 μ l cada hora hasta completar 24 h, a partir del momento en el que no se detectó crecimiento en el estudio anterior, para observar concentraciones de microorganismos supervivientes entre 1-100 UFC/ml.

Estudio de citotoxicidad

El estudio de citotoxicidad se realizó con la línea celular MRC5, compuesta por fibroblastos fetales diploides de tejido pulmonar humano. Se sembraron estas células por quintuplicado, con una concentración de 100.000 células/ml, en placas de 96 pocillos de fondo plano con MEM10 procedente de 25 ml incubados 24 h con una muestra de V.A.C. Granufoam Silver[®] de 3,2 cm \times 2 cm \times 0,5 cm, y en MEM10 incubado de igual forma pero con el doble de tejido. Como control de crecimiento se usó MEM10. Pasadas 24 h de incubación a 36 °C y con una atmósfera al 5% de CO₂, se tiñeron las células supervivientes con cristal violeta, se extrajo el colorante con metanol y se midió la absorbancia de luz del colorante retenido por las células en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 640 nm.

Estudio de liberación de plata

Se tomaron muestras de PBS en contacto con V.A.C. Granufoam Silver[®] en las mismas condiciones que en el estudio de letalidad a los 0 min, 30 min, 1 h, 3 h, 6 h, 12 h y 24 h, y se determinó la cantidad de Ag⁺ liberada mediante la técnica *Inductively Coupled Plasma Mass* (ICP-MS). Brevemente: la muestra líquida es introducida mediante un nebulizador y gas argón en forma de aerosol en un plasma generado a su vez mediante una corriente de argón que alcanza temperaturas de hasta 8.000 °C. A estas temperaturas un elevado porcentaje de átomos es ionizado. Se genera un chorro de iones que es conducido a través de una interfase con presiones decrecientes hasta alcanzar el vacío en un analizador de masas que es capaz de seleccionar la relación masa/carga del metal a

determinar, eliminando de la trayectoria lo que no interesa para que el metal a estudio llegue al detector. Cuanto más metal de interés llega al detector, mayor es la señal eléctrica que genera, lo que permite cuantificarlo comparando esta señal con la de una recta de calibración⁶.

Las muestras fueron diluidas previamente a 1/10 en ácido nítrico al 0,5% por la salinidad del PBS, analizadas en el equipo y cuantificadas con rodio como estándar interno.

Análisis estadístico

Los tiempos de letalidad de los diferentes microorganismos fueron contrastados mediante el test U de Mann-Whitney, mientras que los resultados del estudio de citotoxicidad fueron contrastados mediante el test de ANOVA. Se estableció como significativa una $p < 0,05$.

Resultados

Los resultados de liberación de Ag⁺ muestran una curva exponencial con un aumento rápido en la concentración de Ag⁺ en la primera media hora y una fase de meseta a partir de las 3 h que se mantiene estable hasta las 24 h (fig. 1) con unos niveles de Ag⁺ aproximados de 0,22-0,24 mg/l.

Los resultados de la letalidad en PBS sobre gramnegativos se muestran en la figura 2. Los bacilos gramnegativos no fermentadores presentaron un rápido descenso tras entrar en contacto con Ag⁺, mientras que las enterobacterias presentaron una fase de meseta inicial seguida de un rápido descenso. *E. coli* fue el gramnegativo más resistente y los recuentos fueron inferiores a 100 UFC/ml tras 6 h de incubación. Se detectó una subpoblación inferior a 100 UFC/ml de *S. maltophilia* detectable hasta las 8 horas y otra de *K. pneumoniae* detectable hasta las 5 horas.

Los resultados de la letalidad en PBS sobre grampositivos se muestran en la figura 3. Los grampositivos fueron los microorganismos más resistentes ($p = 0,02$; U de Mann-Whitney), y *E. faecium* fue el más resistente de todos sobre los que se ensayó V.A.C. GranuFoam Silver[®], obteniéndose recuentos inferiores a 100 UFC/ml a las 16 h, pero con una subpoblación detectable hasta las 24 h.

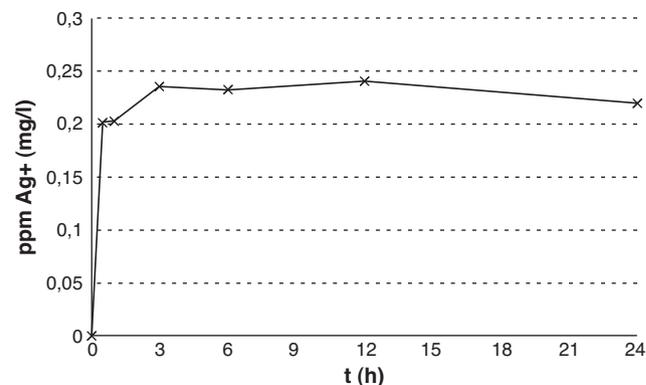


Figura 1 – Curva de liberación de Ag⁺ en PBS por V.A.C. GranuFoam Silver[®].

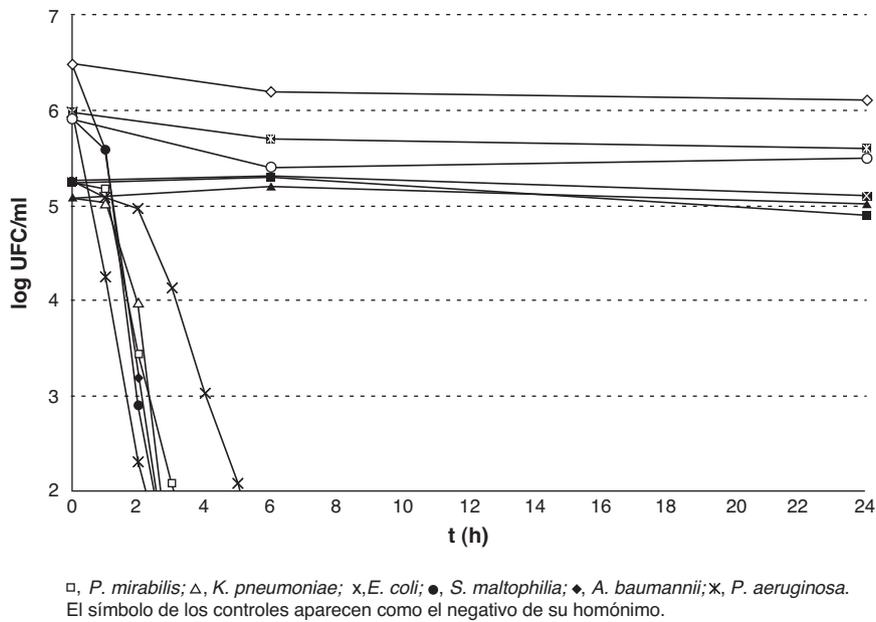


Figura 2 – Curvas de letalidad en gramnegativos con Phosphate Buffered Saline.

Los resultados de letalidad en MEM10 se muestran en la tabla 1 y la figura 4. Los resultados fueron similares a los obtenidos con PBS, excepto por la prolongación de los tiempos de disminución de UFC/ml y de supervivencia, sobre todo en los grampositivos, y en especial en *S. aureus*.

En los recuentos de microorganismos viables se observó, tras una hora de contacto con Ag^+ en los gramnegativos y dos horas en los grampositivos, dos tipos de colonias: unas de morfología normal y una cantidad variable (10-50%) de microcolonias dependiendo del microorganismo.

El estudio de citotoxicidad no mostró ninguna diferencia significativa ($p = 0,7$; ANOVA) entre los controles de crecimiento celular y las células incubadas con V.A.C. Granufoam Silver[®] a las diferentes concentraciones (fig. 5), no observándose tampoco ningún efecto citopático.

Discusión

Los hallazgos más relevantes de este estudio son: a) V.A.C. Granufoam Silver[®] alcanzó rápidamente y mantuvo niveles

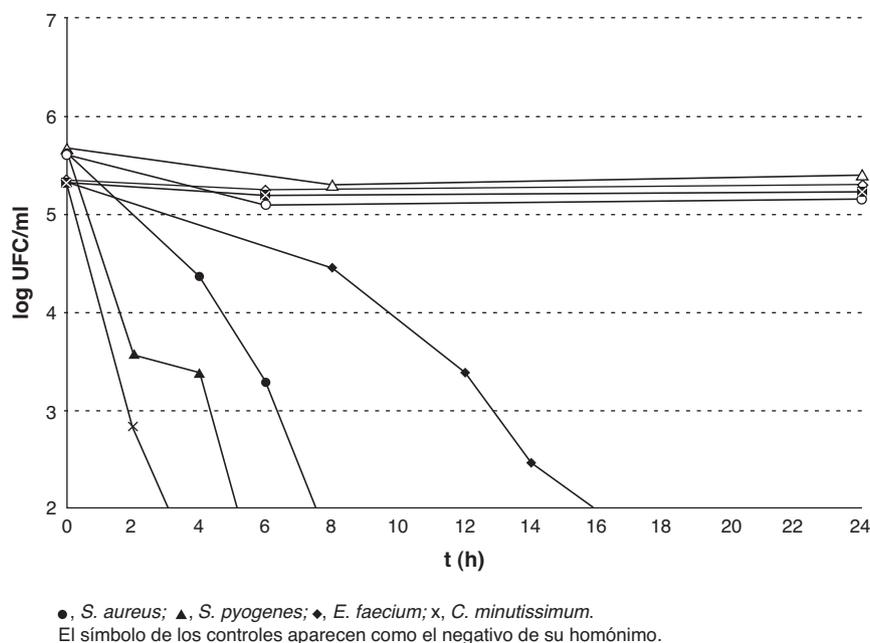


Figura 3 – Curvas de letalidad en grampositivos con Phosphate Buffered Saline.

Tabla 1 – Tiempo medio de supervivencia de los microorganismos estudiados con MEM10

	n	t
<i>E. coli</i>	7	8,29 ± 2,1
<i>S. maltophilia</i>	4	6,00 ± 3,4
<i>A. baumannii</i>	5	6,20 ± 2,8
<i>P. aeruginosa</i>	6	5,33 ± 0,8
<i>K. pneumoniae</i>	6	7,17 ± 2,0
<i>P. mirabilis</i>	5	2,60 ± 1,3
<i>S. aureus</i>	5	48,60 ± 8,0
<i>E. faecium</i>	5	47,20 ± 7,2

n: número de cepas; t: tiempo medio (h) ± desviación típica.

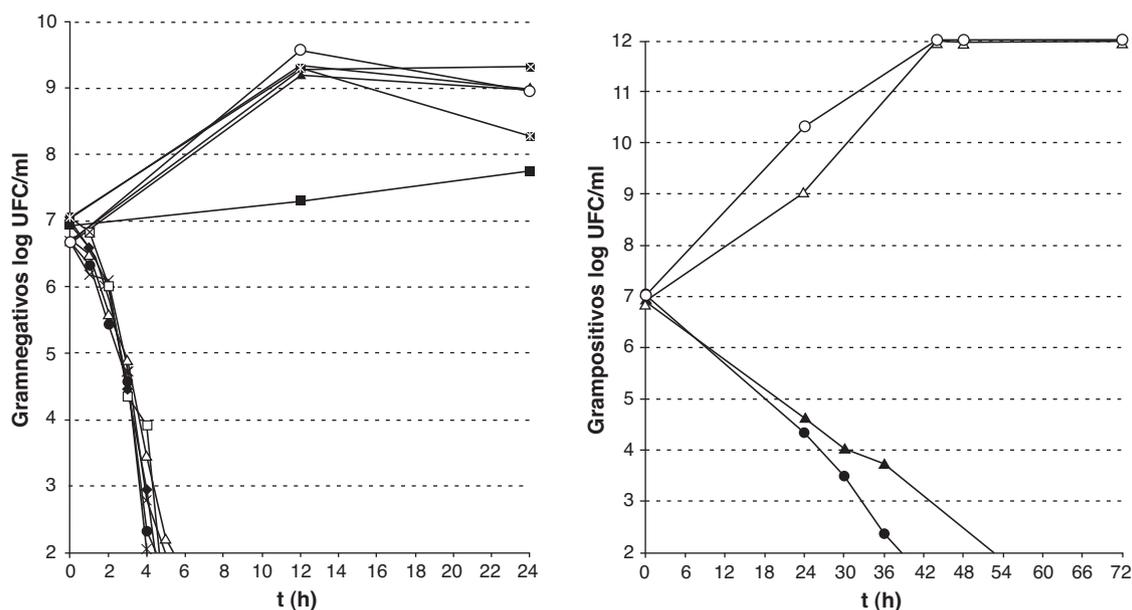
de Ag^+ en rangos que resultaron bactericidas frente a todos los microorganismos sobre los que se ensayó; b) en 3 h se logró una reducción del inóculo inicial superior al 99,9% en todos los gramnegativos excepto en *E. coli* que fue del 92,5%; c) la reducción fue superior al 99% a las 2 h en *S. pyogenes* y *C. minutissimum*, a las 6 h en *S. aureus* y a las 14 h en *E. faecium*; y d) las concentraciones de Ag^+ utilizadas no fueron citotóxicas sobre fibroblastos humanos.

V.A.C. Granufoam Silver[®] ha demostrado tener en este estudio una buena capacidad bactericida frente a todos los microorganismos frente a los que fue ensayado. Asimismo, los resultados obtenidos muestran que la sensibilidad a Ag^+ varía entre los distintos patógenos. En un extremo, tenemos un grupo muy sensible que corresponde a los bacilos gramnegativos no fermentadores. Estos presentaron un descenso en el recuento de células viables muy acusado tras entrar en contacto con Ag^+ , del 99,9% tras dos horas y, en el caso de *P. aeruginosa*, del 98,1% en la primera hora. Sin embargo, *S. maltophilia* exhibió una subpoblación muy pequeña que fue capaz de subsistir hasta las 8 h. Por otro lado, las enterobac-

terias mostraron una mayor tolerancia inicial, probablemente relacionada con la concentración de Ag^+ , que no alcanzó su máxima concentración hasta las tres horas. En el caso de los grampositivos, *C. minutissimum* y *S. pyogenes*, presentaron unos tiempos de eliminación parecidos a los de las enterobacterias. *S. aureus* resistente a la meticilina sobrevivió más que ningún gramnegativo pero el 99,5% de su población había sido erradicada en 6 horas. *E. faecium* representa un caso particular, con células viables hasta las 24 h de exposición. Los mecanismos por los que este aislado sobrevivió tanto tiempo nos son desconocidos, pero, es interesante que, mientras que los mecanismos de resistencia a Ag^+ descritos hasta el momento en diversas especies corresponden a bombas de expulsión codificadas en plásmidos^{7,8}, un miembro del género *Enterococcus*, *E. hirae*, posee una bomba de expulsión de cobre (CopB) de codificación cromosómica que es capaz de eliminar Ag^+ del citoplasma celular⁹.

Nuestros datos concuerdan con estudios previos en los que encontraron una mayor sensibilidad a Ag^+ en gramnegativos frente a grampositivos¹⁰⁻¹⁵, explicable en parte por el mayor grosor de la capa de peptidoglucano que confiere cierto efecto protector¹⁰. Además, las microcolonias encontradas tras la exposición a Ag^+ podrían corresponder a microorganismos con una menor viabilidad tras acumular daños en la membrana celular¹⁰, o en enzimas, proteínas y ribosomas¹⁶, y serían el estado previo a las «bacterias activas pero no cultivables» descritas por Jung et al¹⁰.

Respecto a la liberación de Ag^+ , V.A.C. Granufoam Silver[®] alcanzó rápidamente concentraciones que resultaron bactericidas. Una revisión de la literatura publicada al respecto puede resultar decepcionante y confusa, ya que, pese al número de artículos publicados, la información que se puede reunir es ambigua^{2,4,7}. No existe una metodología común entre los estudios, el material usado para los estudios de letalidad



Gramnegativos: □, *P. mirabilis*; Δ, *K. pneumoniae*; x, *E. coli*; ●, *S. maltophilia*; ◆, *A. baumannii*; *, *P. aeruginosa*.
El símbolo de los controles aparecen como el negativo de su homónimo.
Grampositivos: ●, *S. aureus*; ◆, *E. faecium*; x. El símbolo de los controles aparecen como el negativo de su homónimo.

Figura 4 – Curvas de letalidad en gramnegativos y grampositivos con MEM10.

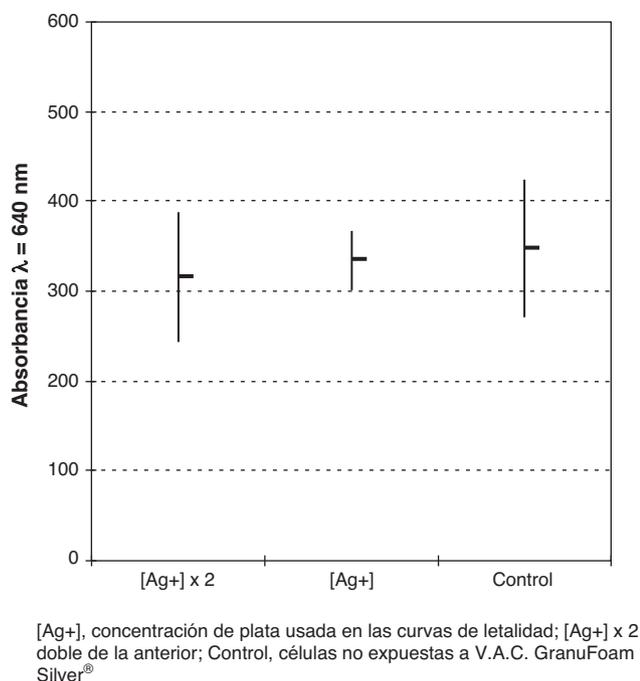


Figura 5 – Absorbancia de luz ($\lambda = 640$ nm) del ensayo de citotoxicidad: media (–) e intervalo de confianza del 95% (|).

diffiere del usado para estudiar la concentración de plata, y encontramos un amplio rango respecto a la concentración de plata necesaria para conseguir un efecto bactericida, que va desde 0,1 mg/l hasta 80 mg/l^{2,4}. Además, los productos estudiados son distintos, aunque todos hablen de concentraciones de plata, unos hablan de AgNO₃, otros de nanopartículas de plata, y otros de iones de plata^{2,12,13}. Nosotros diseñamos el estudio en función de la situación a la que se iba a enfrentar V.A.C. Granufoam Silver® en condiciones reales, es decir, una herida con un exudado isotónico. Nuestros resultados fueron comparables a los descritos por Jung et al¹⁰ respecto a las concentraciones de Ag⁺ con capacidad bactericida en PBS; mientras que en nuestro estudio observamos una buena respuesta con 0,20-0,24 ppm, ellos la detectaron con 0,2 ppm.

Otro factor muy importante a tener en cuenta a la hora de comparar resultados es el nivel de halógenos, como el Cl⁻ presentes en el medio en el que se realiza el ensayo, ya que a concentraciones bajas tienden a formar precipitados poco solubles, disminuyendo por tanto su biodisponibilidad; a altas concentraciones, se forman complejos aniónicos como AgCl₂⁻ y AgCl₃²⁻ que penetran mejor en la membrana celular aumentando la cantidad de Ag⁺ biodisponible, hasta el punto de hacer sensibles incluso a bacterias con plásmidos que confieren resistencia a Ag⁺ mediante bombas de expulsión o por deficiencia en porinas¹⁷. Nuestro experimento se realizó en un medio isotónico, con una concentración de cloro ¼ superior a la esperada en un exudado de una herida, 139 mM/l en PBS vs. 106 mM/l en plasma, y en MEM10 con características muy similares a las de un exudado humano.

La realización del estudio de letalidad usando MEM10 e inóculos muy elevados de microorganismos nos ha permitido

realizar una aproximación a una situación *in vivo*, obteniendo resultados muy positivos. Los gramnegativos fueron los más sensibles a la plata, mientras que *S. aureus* y *E. faecium* mostraron una mayor resistencia, pero con una completa erradicación a las 48-72 h.

Por último, todo lo anterior no serviría de nada si la zona que va a estar en contacto con la malla de poliuretano se viera dañada por la misma, o el proceso de cicatrización retrasado. Nuestros datos indican que las cantidades de Ag⁺ utilizadas son seguras, ya que no afectaron a los fibroblastos humanos que fueron expuestos a las mismas.

En conclusión, V.A.C. Granufoam Silver® liberó Ag⁺ al medio en concentraciones bactericidas que no fueron perjudiciales para los fibroblastos humanos. Pese a que los tiempos en los que se consiguió una total erradicación variaron en función del microorganismo, y se observaron algunas subpoblaciones más resistentes, todos los aislados disminuyeron su población en más del 99% tras 6 horas de exposición en PBS, salvo *E. faecium* que necesitó 14 horas. Los resultados obtenidos con MEM10 merecen estudios más pormenorizados, pero hay que señalar que se alcanzó una eliminación superior al 99% de los gramnegativos en 6 horas, y de los grampositivos en 24 horas. Las indicaciones de uso de V.A.C. Granufoam Silver® recomiendan el cambio del apósito cada 48 horas, por lo que se presenta por tanto como una buena alternativa para el control y prevención de las infecciones en heridas.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

Nuestros agradecimientos a KCi Spain por proporcionarnos las muestras de espuma de poliuretano con Ag⁺, V.A.C. GranuFoam Silver®.

BIBLIOGRAFÍA

1. Heródoto de Halicarnaso. Los Nueve Libros de la Historia, Nueva edición. Barcelona: Iberia S.A.. 1976.
2. Brett DW. A discussion of silver as an antimicrobial agent: alleviating the confusion. *Ostomy Wound Manage.* 2006;52:34-41.
3. Wright JB, Lam K, Burrell RE. Wound management in an era of increasing bacterial antibiotic resistance: a role for topical silver treatment. *Am J Infect Control.* 1998;26:572-7.
4. Chopra I. The increasing use of silver-based products as antimicrobial agents: a useful development or a cause for concern? *J Antimicrob Chemother.* 2007;59:587-90.
5. Joyce-Wöhrmann RM, Münstedt H. Determination of the silver ion release from polyurethanes enriched with silver. *Infection.* 1999;27 Suppl 1:46-8.
6. Montasser A. Inductively coupled plasma mass spectrometry. Berlin: Wiley-VCH. 1998.
7. Silver S, Gupta A, Matsui K, Lo JF. Resistance to Ag(i) cations in bacteria: environments, genes and proteins. *Met Based Drugs.* 1999;6:315-20.

8. Li XZ, Nikaido H, Williams KE. Silver-resistant mutants of *Escherichia coli* display active efflux of Ag⁺ and are deficient in porins. *J Bacteriol.* 1997;179:6127-32.
9. Solioz M, Stoyanov JV. Copper homeostasis in *Enterococcus hirae*. *FEMS Microbiol Rev.* 2003;27:183-95.
10. Jung WK, Koo HC, Kim KW, Shin S, Kim SH, Park YH. Antibacterial activity and mechanism of action of the silver ion in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* 2008;74:2171-8.
11. MacKeen PC, Person S, Warner SC, Snipes W, Stevens Jr SE. Silver-coated nylon fiber as an antibacterial agent. *Antimicrob Agents Chemother.* 1987;31:93-9.
12. Ip M, Lui SL, Poon VK, Lung I, Burd A. Antimicrobial activities of silver dressings: an in vitro comparison. *J Med Microbiol.* 2006;55:59-63.
13. Jain J, Arora S, Rajwade JM, Omray P, Khandelwal S, Paknikar KM. Silver nanoparticles in therapeutics: development of an antimicrobial gel formulation for topical use. *Mol Pharm.* 2009;6:1388-401.
14. Asavavisithchai S, Oonpraderm A, Ruktanonchai UR. The antimicrobial effect of open-cell silver foams. *J Mater Sci Mater Med.* 2010;21:1329-34.
15. Payne JL, Ambrosio AM. Evaluation of an antimicrobial silver foam dressing for use with V.A.C. therapy: morphological, mechanical, and antimicrobial properties. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2009;89:217-22.
16. Yamanaka M, Hara K, Kudo J. Bactericidal actions of a silver ion solution on *Escherichia coli*, studied by energy-filtering transmission electron microscopy and proteomic analysis. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71:7589-93.
17. Gupta A, Maynes M, Silver S. Effects of halides on plasmid-mediated silver resistance in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* 1998;64:5042-5.