



Özgün Araştırma / Original Article

Ortopedik Enfeksiyonların Tedavisinde Sodyum Hipoklorit'in Yeri Var mıdır?

Şeymus Yiğit¹, Mehmet Sait Akar¹, Erdal Özbek²

1 Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ortopedi Anabilim Dalı Diyarbakır, Türkiye

2 Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Diyarbakır, Türkiye

Geliş: 15.04.2020; Revizyon: 11.06.2020; Kabul Tarihi: 12.06.2020

Öz

Amaç: Ortopedik cerrahide periprotetik, eklem (septik artrit) ve diabetik yara enfeksiyonlar tedavisi zor ve uzun zaman almaktadır. Bakteriler tarafından artan antibiyotik direnci nedeniyle lokal antiseptikler her geçen gün daha fazla önem kazanmışlardır. Bu çalışmanın amacı, sodyum hipoklorit ve günlük ortopedik pratikte sıkça kullanılan povidin iyot gibi bakterisidal dezenfektanın biofilm oluşturan *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E.coli*, *P. aeruginosa* suşları üzerinde etkinliğini değerlendirmektir.

Yöntemler: Bu çalışmada, dezenfektan olarak %0,08'lik sodyum hipoklorit (HYPNOS, Türkiye), %3,5 povidoniyot (ORBAK Kimya, Türkiye), test edilen mikroorganizmalar ise *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC-15442 suşları kullanılmıştır. Dezenfektanların etkinliğini saptamak için Kelsey-Sykes metodu modifiye edilerek kullanılmıştır. Her bir mikroorganizmadan ayrı ayrı bakteri süspansiyonu hazırlanmıştır. Tüpler 35°C'de 48 saat bekletilmiştir. 48 saatlik inkubasyondan sonra tüplerden 0.01 ml özelerle %5 koyun kanlı agar (RTA© İstanbul, TR) besiyerlerine pasaj yapılarak 24 saat 35°C'de inkube edilmiştir. 24 saatin sonunda plaklar üreme yönünden değerlendirilmiştir.

Bulgular: Sodyum hipoklorit (%0,08') ile 2 dk maruziyet sonucu *S. aureus*, *S.epidermidis*, *E. coli* suşlarındaki bakterilerin tamamı ölüyor, *P. aeruginosa* suşundaki bakterilerin bir kısmı yaşamış ve kültürde yeniden üreme olmuştur. Povidon iyot (%0,35) ile 2 dk maruziyet sonucu *S. aureus* ve *S.epidermidis* suşlarındaki bakterilerin tamamı ölüyor, *E. coli* ve *P. aeruginosa* suşundaki bakterilerin bir kısmı yaşamış ve kültürde yeniden üreme olmuştur. Sodyum hipoklorit (%0,08') ve Povidon iyot (%0,35) ile 5 dk maruz kalındığında tüm bakteri suşlarının öldüğünü saptadık.

Sonuç: Sodyum hipoklorit güçlü bakterisidal etkiye sahiptir ve çok ilaca dirençli organizmaların eklem dışı yüzeysel veya periprotetik enfeksiyonlarında kullanılabilir. Doku toksitesi için ek çalışmalara ihtiyaç vardır.

DOI: 10.5798/dicletip.755778

Correspondence / Yazışma Adresi: Şeymus Yiğit, Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ortopedi Anabilim Dalı Diyarbakır, Türkiye e-mail: dryigit8884@hotmail.com

Anahtar kelimeler: Sodyum hipoklorit; biyofilm; bakterisidal etki; ortopedik enfeksiyonlar

Does Sodium Hypochlorite Have a Place in the Treatment of Orthopedic Infection?

Abstract

Objective: In orthopedic surgery, treatment of periprosthetic, joint (septic arthritis) and diabetic wound infections are difficult and takes a long time. Due to the increased antibiotic resistance by bacteria, local antiseptics have gained more importance day by day. The aim of this study is to evaluate the efficacy of bactericidal disinfectants such as sodium hypochlorite and povidone iodine, which are frequently used in daily orthopedic practice, on strains of *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*.

Methods: In this study, 0.08% sodium hypochlorite (HYPNOS, Turkey) and 0.35% povidoniyot (ORBAK Chemistry, Turkey) as a disinfectant, the test microorganisms are *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC- 15442 strains were used. The Kelsey-Sykes method with modified was used to determine the effectiveness of disinfectants. Separate bacterial suspension was prepared from each microorganism. Tubes were kept at 35 ° C for 48 hours. After 48 hours of incubation, passages of 5% sheep blood agar (RTA © Istanbul, TR) with 0.01 ml extracts from tubes were incubated at 35 ° C for 24 hours. At the end of 24 hours, plates were evaluated for reproduction.

Results: All of the bacteria in *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli* strains died after 2 min exposure with sodium hypochlorite (0.08%). Some of the bacteria in the *aeruginosa* strain lived and reproduced in culture. As a result of 2 min exposure with povidone iodine (0.35%), all bacteria in *S. aureus* and *S. epidermidis* strains died, while some of the bacteria in *E. coli* and *P. aeruginosa* strain lived and reproduced in culture. We detected that all bacterial strains died when exposed to sodium hypochlorite (0.08%) and Povidone iodine (0.35%) for 5 minutes.

Conclusions: Sodium hypochlorite has a strong bactericidal effect and can be used in extra-articular superficial or periprosthetic infections of multidrug-resistant organisms. Additional studies are needed for tissue toxicity.

Keywords: Sodium hypochlorite; biofilm; bactericidal effect; orthopedic infections.

GİRİŞ

Ortopedik cerrahide periprostetik, eklem (septik artrit) ve diabetik yara enfeksiyonlarının tedavileri zor ve uzun zaman almaktadır. Periprostetik enfeksiyon (PPE), protezi ve implantı çevreleyen dokuları içeren bir enfeksiyonu ifade eder^{1,2}. Periprostetik enfeksiyonlar total diz artroplastisi revizyonunun birinci ve total kalça artroplastisi revizyonunun üçüncü en yaygın nedenidir². 2019 yılında yapılan bir çalışmada, primer diz artroplastileri sonrasında yaklaşık %1,6 ve primer kalça artroplastileri sonrasında %0,2-1,1 oranında komplike protez enfeksiyonu olduğu gösterilmiştir^{3,4}. Periprostetik enfeksiyon, diyabetik ayak yaraları ve septik artrit debridmanları gibi durumlarda lokal antiseptik kullanımı yoğun olarak uygulanmakla beraber bu konuda oluşmuş bir fikir birliği henüz mevcut değildir⁵.

Staphylococcus aureus, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* gibi bazı mikroorganizmalar,

glikoproteinleri sentezleyebilir, bunu biyofilm veya glikokaliks'e dönüştürebilir, oluşturdukları biyofilm sayesinde mikroorganizmayı vücudun bağışıklık tepkisinden ve antibiyotiklerden koruyabilir. Biyofilmdeki bakteriler antibiyotiklere biyofilmde olmayan bakterilere göre 1000 kat daha dayanıklıdır².

Ortopedide enfeksiyonların tedavisi için lokal antiseptiklerin kullanımı, bakterilerin antibiyotiklere (örn. VRE, 4-MRGN) karşı artan direncinden dolayı giderek önem kazanmaktadır. Enfeksiyondan iyileşme büyük ölçüde ilgili patojenlerin direnç modellerine bağlıdır⁶. Şimdiye kadar kullanılan antiseptiklerin neredeyse tamamı (klorheksidin, poliheksanid, hidrojen peroksit, oktenidin dihidroklorür, povidon-iyot ve sodyum hipoklorür) bakterisidal etkilere sahiptir ve antibiyotik direnç mekanizmalarından etkilenmezler.

Literatürde povidin iyota⁷, klorheksidine⁸ bakteri direncinin olduğunu bildiren çalışmalar

vardır. Sodyum hipoklorüre direnç gösteren bakteri suşu gösterilmemiştir. Antiseptiklerin bakterisit etkileri pek çok çalışmada incelenmiştir. Ancak dört farklı bakteri türü ve iki farklı antiseptik çalışma bilginiz dahilinde yapılmamıştır. Bu çalışmanın amacı, doku hasarı oluşturmayacak maksimum etki konsantrasyonlarda sodyum hipoklorit ve günlük ortopedik pratikte sıkça kullanılan povidin iyot gibi bakterisidal antiseptiklerin biofilm oluşturan *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC-15442 suşları üzerinde etkinliğini değerlendirmektir. Sodyum hipokloritin povidin iyottan daha etkili olacağını varsaydık.

YÖNTEMLER

Dört farklı standart bakteri suşu ile yapılan deneysel gözleme dayalı orijinal çalışmadır.

Kullanılan materyaller: Bu çalışmada, dezenfektan olarak %0,08'lik sodyum hipoklorit (HYPNOS, Türkiye), %0,35 povidoniyot (ORBAK Kimya, Türkiye), test edilen mikroorganizmalar ise *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC-15442 suşları kullanılmıştır.

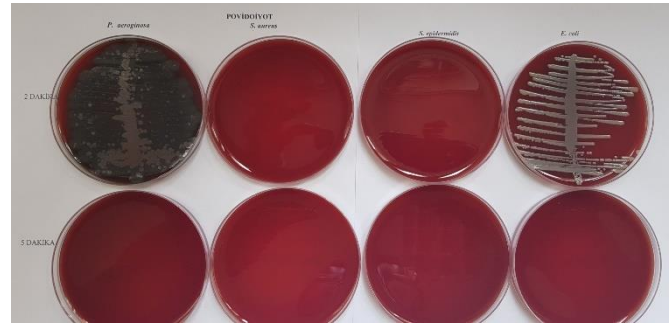
Bu çalışmada dezenfektanların etkinliğini saptamak için Kelsey-Sykes metodu modifiye edilerek kullanılmıştır⁹. Her bir mikroorganizmadan ayrı ayrı bakteri süspansiyonu hazırlanmıştır. Süspansiyonlar içlerindeki mikroorganizma sayısı 10⁸ koloni oluşturan birim/ml olacak şekilde Mc Farland 0.5'e göre ayarlanmıştır. Bu şekilde hazırlanan 6 ml bakteri süspansiyona organik madde olarak 4 ml %10 inaktive edilmiş at serumu ile karıştırılmıştır.

Dezenfektan çözeltileri tüplere 5 ml olacak şekilde hazırlanmıştır. Ayrıca bir tüpe 5 ml steril salin solüsyonu konulmuştur.

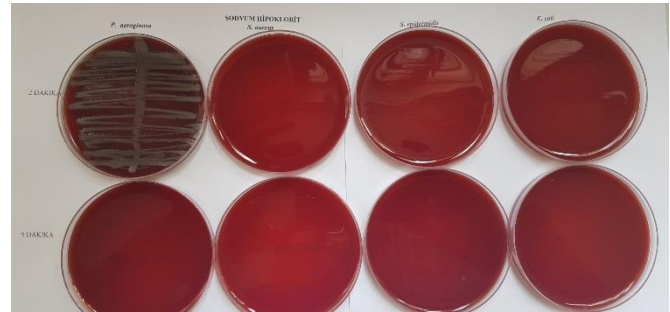
Daha sonra bu tüplere 5 ml bakteri süspansiyonlarından eklenmiştir. 2 ve 5 dakikalarda, içlerinde 5 ml sıvı besiyeri ve tween 80 bulunan 5 tüpe, dezenfektan+mikroorganizma çözeltilerinden 0.02 ml aktarılmıştır. Tüpler 35°C'de 48 saat bekletilmiştir. 48 saatlik inkubasyondan sonra tüplerden 0.01 ml özellerle %5 koyun kanlı agar (RTA© İstanbul, TR) besiyerlerine pasaj yapılarak 24 saat 35°C'de inkübe edilmiştir.

24 saatin sonunda plaklar üreme yönünden değerlendirilmiştir (Resim 1, Resim 2).

Standart bakteri suşlarıyla çalışıldığında etik kurul onayı gerekmediği için etik onay alınmadı.



Resim 1: Povidon iyot 'a maruz bırakılan bakterilerin 24 saatin sonunda üremesi



Resim 2: Sodyum hipoklorit'e maruz bırakılan bakterilerin 24 saatin sonunda üremesi

BULGULAR

Sodyum hipoklorit (%0,08') ile 2 dk maruziyet sonucu *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli* suşlarındaki bakterilerin tamamı ölürken, *P. aeruginosa* suşundaki bakterilerin bir kısmı yaşamış ve kültürde yeniden üreme olmuştur. Sodyum hipoklorit (%0,08') ile 5 dk maruziyet

sonucu tüm bakteri suşlarındaki bakterilerin tamamı eradike edilmiştir.

Povidon iyot (%0,35) ile 2 dk maruziyet sonucu *S. aureus* ve *S.epidermidis* suşlarındaki bakterilerin tamamı ölürken, *E. coli* ve *P. aeruginosa* suşundaki bakterilerin bir kısmı yaşamış ve kültürde yeniden üreme olmuştur. Povidon iyot (%0,35) ile 5 dk maruziyet sonucu tüm bakteri suşlarındaki bakterilerin tamamı eradike edilmiştir.

Povidon iyode kıyasla 2 dk sodyum hipoklorit ile maruz kalındığında *P. aeruginosa* suşlarında daha fazla bakteri öldüğünü saptadık (Tablo I).

Tablo I: Bakterisidal etki

	%0,08'lik sodyum hipoklorit		%0,35 povidon iyot	
	2 dakika	5 dakika	2 dakika	5 dakika
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	-	-	-	-
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	-	+	-
<i>P. aeruginosa</i> ATCC-15442	+	-	+	-

TARTIŞMA

Günümüzde, periprostetik, diabetik yara ve eklem (septik artrit) enfeksiyonlarının tedavisi hala çözülmemiş bir sorundur. Bakterilerin antibiyotiklere (örn. VRE, 4-MRGN) karşı artan direncinden dolayı antiseptikler alternatif bir tedavi olarak önem kazanmışlardır. Çok ilaca dirençli bakteriyel suşlarda antiseptikler duyarlılığı konusunda literatür eksikliği vardır. Sodyum hipoklorit (NaOCl), geniş antimikrobiyal spektrum, hızlı bakterisidal etki, suda yüksek eriyebilirlik ve normal dozlarda düşük toksisite gibi yararlı dezenfektan özelliklere sahiptir¹⁰. Klor protein

denatürasyonunun inhibisyona neden olur¹⁰. Ayrıca, hipokloritlerin, nükleotid bazların klorlu türevlerinin oluşumundan DNA sentezi üzerinde birden fazla hedef ve zararlı etkileri olduğu düşünülmektedir¹¹. Povidon-iyot, polivinilpirolidon ve %1 mevcut iyottan oluşan antiseptik bir çözeltilidir¹². İyot hücre yüzeyine ulaştığında, hücreye girebilir ve sitoplazmik zarın ve sitoplazmadaki moleküllerin çeşitli bileşenlerini oksitleyebilir¹³. Bu onların inaktivasyonu ile sonuçlanır¹⁴. Bu nedenle, povidon-iyodinin sitotoksitesi, hücre çeperine verilen iyot konsantrasyonu ile orantılıdır¹⁵. Bildiğimiz kadarıyla literatürde günlük ortopedik pratikte sıkça kullanılan povidin iyot ve sodyum hipoklorit dört farklı bakteri türü ile bakterisidal etki karşılaştırma çalışması yapılmamıştır. Bu çalışmada, sodyum hipoklorürün povidin iyot ile seçilmiş *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* suşlarına karşı in vitro bakterisidal etkinliği değerlendirildi. Minimum doku hasarı oluşturacak ve maksimum etkili olacak konsantrasyonlarda sodyum hipokloritin povid'in iyottan daha etkili olduğu sonucu hipotezimizi destekledi.

Röhner¹⁶ %0,08'lik sodyum hipoklorit ile 2 dk ve 5dk maruz kaldığında kondrositlere karşı 2 dk' dan sonra %80 toksisite tespit etmiş ancak 5 dk' dan sonra toksisitede artış saptamamışlardır. Fakat periprostetik enfeksiyonların tedavisinde yüksek klinik uygunluğa sahip olabileceklerini vurgulamışlardır¹⁶. Çalışmamızdaki %0,08'lik sodyum hipoklorit konsantrasyonu Röhner'in belirttiği konsantrasyondur. Kaysinger ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada sığır kondrositlerinde hem artan konsantrasyonlarda hem de aynı konsantrasyonlarda maruz kalma süresiyle ilişkili olarak sitotoksosite geliştiği saptanmış¹⁷. Yüzde 0.35'lik bir povidon-iyot konsantrasyonu, en az kondrotoksikti, ancak

yine de bir dakikadan daha uzun süre uygulandığında hücre canlılığını azalttığı görülmüş. Kültürlenmiş embriyonik tavuk tibia osteoblastlarında %5 povidonyot konsantrasyonunda sitotoksikite gözlenirken, %0,5'lik bir povidon-iyot konsantrasyonunda daha az sitotoksik etki meydana geldiği görülmüş¹⁷. Çalışmamızda sodyum hipoklorit ve povidin iyot etkinliğinin süre ve konsantrasyona bağlı olduğu görüldü. Ortopedik pratikte sıklıkla enfeksiyon kaynağı olan *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. Coli* suşları %0,08'lik sodyum hipoklorit ile 2 dk maruz kaldıklarında %100 ölmektedir. Ancak *P. aeruginosa* suşu %0,08'lik sodyum hipoklorit ile 5 dk maruz kalınca tam eradike olduğu görüldü. *E. coli* ve *P. aeruginosa* suşlarına %0,35 povidin iyot ile 2 dk maruziyetin etki etmediği görüldü. Cichos ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada %1 povidon iyot un Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Staphylococcus epidermidis*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* ve *Escherichia coli* temas anında bile tüm suşları yok ettiği saptanmış. Bizim çalışmamızla karşılaştırdığımızda periprostetik enfeksiyon önlenmesinde kullanılan %0,35 konsantrasyonlarda en azından 5 dakika beklenmesi sonucuna ulaşılmaktadır¹⁸. Povidon iyodun kondrosit üzerinde toksitesi zamanla artarken, sodyum hipokloritin toksitesi klor uçucu olduğundan zamanla artmaz. Sodyum hipoklorit (tipik olarak %1-5 çözeltileri) endodontik tedavi sırasında kök kanallarını temizlemek için diş hekimleri tarafından yaygın olarak kullanılmaktadır. Sodyum hipoklorit güçlü bakterisidal etkiye sahiptir ve çok ilaca dirençli organizmaların eklem dışı yüzeyel veya periprostetik enfeksiyonlarında kullanılabilir. Burada önemli olan doku toksisitesi ile enfeksiyon ajanlarına etkili minimal etkin konsantrasyon arasındaki dengeyi yakalayabilmektir. Bunun için daha kapsamlı çalışmaların yapılması gerekmektedir

Bakteriyel biyofilmler mikrobiyal ve kronik enfeksiyonların sırasıyla %65 ve 80'ini oluşturmaktadır¹⁹. 2012 yılında yapılan bir araştırma, biyofilmlerin periyodik olarak çevreye planktonik bakteri hücrelerini salarak enfeksiyon kaynağı olabileceğini düşündürmektedir²⁰. Biyofilmlerin antiseptiklere toleransı antiseptiklerin aktif, sıcaklık ve yüzey tipine bağlıdır²¹. Çalışmamızı özellikle ortopedik enfeksiyonların sık nedeni olan ve biyofilm oluşturan 4 bakteri suşu ile yapmamızın nedeni bu çoklu ilaca direnç geliştiren bu bakterilere karşı antiseptiklerin etkilerini araştırmaktır. 2011 yılında yapılan bir çalışmada da görüldüğü gibi, diyabetik ayak ülserli yatan hastalarda ilaca dirençli organizmaların (ÇİDO) prevalansının yüksek olduğu bilinmektedir²². Dakin solüsyonunun, tedavi stratejimizi daha da geçerli kılan diğer antiseptiklerle karşılaştırıldığında ÇİDO'lara karşı üstün aktiviteye sahiptir²³. Bruno²⁴, Dakin solüsyonuyla (%5 Sodyum hipoklorit içerir) düzenli olarak pansuman yapılan 9 cm genişliğinde diyabetik yara enfeksiyonunu tedavi etti. Hiçbir yan etki kaydedilmedi. Yara 6 hafta sonra tamamen granüle oldu. Willy ve ark.²⁵ antiseptik yara temizleme solüsyonlarının gözden geçirilip ortopedik cerrahide uygulama için bir öneri formüle etti. Önerilen antiseptikler hidrojen hipoklorit, povidon-iyot ve polihexanit idi. Yazarlar ayrıca hidrojen hipokloritin düşük doku toksisitesi ve hızlı bakterisidal kapasiteler gösterdiğini bildirmişlerdir²⁵.

Bu çalışmanın bazı sınırlamaları vardır. Sonuçlar in vitro bir ortamda elde edildi ve in vivo koşullara tamamen aktarılamaz. İn vivo uygulanan antiseptikler, sinovyal membran ve kırıldak matrisi gibi doğal bariyerlerin üstesinden gelmek zorundadır ve etkileri de kanla etkileşimlerle zayıflatılabilir. Bununla birlikte, bu antiseptik çözeltilerin her birinin kemik canlılığı ve daha sonra kemik yeniden şekillenmesi üzerindeki etkisini tam olarak

karakterize etmek için gelecekte in vivo çalışmalar da gerekli olabilir

SONUÇLAR

İdeal topikal bakterisidal ajan etkili olmalı, hasta için toksik olmamalı, direncin gelişmesine yol açmamalı ve uygun maliyetli olmalıdır. Sodyum hipoklorit güçlü bakterisidal etkiye sahiptir ve ilaca dirençli organizmaların eklem dışı yüzeysel veya periprostetik enfeksiyonlarında kullanılabilir. Doku toksitesi için ek çalışmalara ihtiyaç vardır

Etik Kurul Kararı: Standart bakteri suşlarıyla çalışıldığında etik kurul onayı gerekmediği için etik onay alınmadı.

Çıkar Çatışması Beyanı: Yazarlar çıkar çatışması olmadığını bildirmişlerdir.

Finansal Destek: Bu çalışma her hangi bir fon tarafından desteklenmemiştir.

Declaration of Conflicting Interests: The authors declare that they have no conflict of interest.

Financial Disclosure: No financial support was received.

KAYNAKLAR

1. Tande AJ, Patel R. Prosthetic joint infection. *Clin Microbiol Rev.* 2014; 27: 302–45.
2. Cyteval C, Bourdon A. Imaging orthopedic implant infections. *Diagn Interv Imaging.* 2012; 93: 547–57.
3. Dong Z, Han L, Song Y, Qi J, Wang F. Hemostatic techniques to reduce blood transfusion after primary TKA: a meta—analysis and systematic review. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2019 Dec; 139: 1785-96.
4. Naranje S, Lendway L, Mehle S, Gioe TJ. Does operative time affect infection rate in primary total knee arthroplasty? *Clin Orthop Relat Res.* 2015; 473: 64–9.
5. Stutz G, Gächter A. Diagnostics and stage-appropriate therapy of joint infections. *Trauma surgeon.* 2001; 104: 682-6.
6. Tigani D, Trisolino G, Fosco M, Ayad RB, Costigliola P. Two-stage reimplantation for periprosthetic knee infection: influence of host health status and infecting microorganism. *Knee.* 2013; 20: 9–18.
7. Bhatia M, Mishra B, Thakur A, Dogra V. Evaluation of susceptibility of glycopeptide-resistant and glycopeptide-sensitive enterococci to commonly used biocides in a super-speciality hospital: a pilot study. *J Nat Sci Biol Med.* 2017; 8: 199-202.
8. Stickler DJ, Clayton CL. The resistance of urinary tract pathogens to chlorhexidine bladder washouts. *J Hosp Infect.* 1987; 10: 28-39.
9. Harrigan WF. *Laboratory Methods in Food Microbiology.* 3rd edn. San Diego-California. Academic Press. 1998: 402-4.
10. Rutala WA, Weber DJ. Uses of inorganic hypochlorite (bleach) in health-care facilities. *Clin Microbiol Rev* 1997; 10: 597–610.
11. Mckenna SM, Davies KJA. The inhibition of bacterial growth by hypochlorous acid. *Biochem J.* 1988; 254: 685–92.
12. Zamora JL. Chemical and microbiologic characteristics and toxicity of povidone-iodine solutions. *Am J Surg.* 1986; 151: 400-6.
13. Rodeheaver G, Bellamy W, Kody M, et al. Bactericidal activity and toxicity of iodine-containing solutions in wounds. *Arch Surg.* 1982; 117: 181-6.
14. Alexander NM. Reaction of povidone-iodine with amino acids and other important biological compounds. In: Degenes G, In: (ed.). *Proceedings of the Internations Symposium on Povidone.* Lexington, KY: University of Kentucky. 1983: 274-88.

15. Rutherford JM. Reaction of povidone-iodine with amino acids and other important biological compounds. In: Degenes G, In: (ed.). Proceedings of the Internations Symposium on Povidone. Lexington, KY: University of Kentucky. 1983: 217-21.
16. Röhner E, Jacob B, Böhle S, et al. Sodium Hypochlorite Is More Effective Than Chlorhexidine for Eradication of Bacterial Biofilm of Staphylococci and Pseudomonas Aeruginosa. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.*2020 Feb 7[Online ahead of print].DOI: 10.1007/s00167-020-05887-9.
17. Kaysinger KK, Nicholson NC, Ramp WK, Kellam JF. Toxic effects of wound irrigation solutions on cultured tibiae and osteoblasts. *J Orthop Trauma.* 1995; 9: 303-11.
18. Cichos KH, Andrews RM, Wolschendorf F, et al. Efficacy of Intraoperative Antiseptic Techniques in the Prevention of Periprosthetic Joint Infection: Superiority of Betadine. *J Arthroplasty.* 2019; 34: 312-8.
19. Jamal M, Ahmad W, Andleeb S, et al. Bacteria biofilms and associated infections. *J Chin Med Assoc.* 2017; 81: 7-11.
20. Vickery K, Deva A, Jacombs A, et al. Presence of biofilm containing viable multiresistant organisms despite terminal cleaning on clinical surfaces in an intensive care unit. *J Hosp Infect.* 2012; 80: 52-5.
21. Bridier A, Briandet R, Thomas V, Dubois-Brissonnet F. Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review. *Biofouling.* 2011; 27: 1017-32.
22. Cabete J, Moniz L, Pinto M, Neves J,Alves CP. Microbiological Profile and Antibiotic Susceptibility Patterns of Organisms Isolated From Diabetic Foot Ulcers in a Portuguese Hospital. *Rev Por Cir CardioToracica e Vascular.* 2011; 18: 53-60.
23. Neely AN, Gardner J, Durkee P, et al. Are topical antimicrobials effective against bacteria that are highly resistant to systemic antibiotics? *J Burn Care Res.*2009; 30: 19-29.
24. Bruno D, Joana C, Ana F, Neves J. Dakin's Solution: Is There a Place for It in the 21st Century? *Int Wound J.* Dec 2017; 14: 918-20.
25. Willy C, Scheuermann-Poley C, Stichling M, von Stein T, Kramer A. The importance of wound irrigation solutions and fluids with antiseptic effects in treatment and prophylaxis: update 2017. *Trauma surgeon.*2017; 120: 549-60.