

**“VICTOR BABEȘ” UNIVERSITY OF MEDICINE AND PHARMACY
FROM TIMISOARA
FACULTY OF MEDICINE
Department XIV Microbiology**

VOINESCU ELENA-ADELA



PHD THESIS

**THE IMPORTANCE OF THE BIOFILM-PRODUCING
PHENOTYPE OF BACTERIAL STRAINS INVOLVED IN OCULAR
SURFACE INFECTIONS**

A B S T R A C T

**Scientific Coordinator:
PROF. UNIV. DR. MUNTEAN DELIA**

**Timișoara
2026**

Introduction

This doctoral thesis is structured into two main parts: a general part, with a theoretical and introductory role, and a special part, which includes the original contributions of the doctoral research. The topic of the thesis focuses on the importance of the biofilm-producing phenotype of bacterial isolates involved in ocular surface infections and on its relationship with antimicrobial resistance and infection persistence.

The choice of this topic was driven by the growing interest in bacterial ocular infections in the context of increasing antimicrobial resistance and the recognition of the role of biofilm in the pathogenesis and progression of these infections. Although bacterial conjunctivitis is one of the most common ocular surface infections, data regarding the relationship between the microbiological characteristics of bacterial isolates, their ability to form biofilm, and their antimicrobial behavior remain limited, particularly in the local and regional clinical setting.

General part

The general part of the thesis is structured into five chapters and aims to present the main theoretical elements necessary for understanding the research topic, from the particular features of the ocular surface and the normal microbiota, to the mechanisms of bacterial pathogenicity, biofilm, antimicrobial resistance, and modern microbiological diagnostic methods.

The first chapter is dedicated to the anatomy, physiology, and microbiology of the ocular surface. This section presents the main structures involved in maintaining the integrity and protection of the ocular surface, namely the conjunctiva, cornea, eyelids, and tear film. It also describes the local anti-infective defense mechanisms, including the role of the epithelial barrier, blinking, the tear film, and the antimicrobial factors present at this level. At the same time, the role of the normal ocular microbiota is analyzed, emphasizing that the ocular surface is not a sterile environment, but rather a balanced ecosystem in which disruption of the host–microorganism relationship may promote colonization by pathogenic organisms and the development of infection.

The second chapter addresses bacterial conjunctivitis, one of the most common ocular surface infections. The definition and classification of this condition, the available

epidemiological data, the main etiologic agents involved, the pathogenic mechanisms, and the associated risk factors are analyzed. This section emphasizes that, although bacterial conjunctivitis is often considered a self-limiting condition, it may present different clinical and microbiological patterns depending on the patient's age, the characteristics of healthcare setting, and the microbiological profile of the isolates involved. Differences between community-acquired infections and healthcare-associated infections are discussed, as well as the importance of recognizing the clinical context when choosing the therapeutic approach.

A central chapter of the general part is devoted to microbial biofilm in ocular infections. This section presents the general characteristics of biofilm, its structure and organization, the stages of its development, and its implications in the main ocular infections. It is highlighted that biofilm represents a form of microbial organization that provides bacteria with important survival advantages, including increased tolerance to antimicrobials and to host defense mechanisms. Particular emphasis is placed on biofilm formed on ocular devices, especially contact lenses, given their role as surfaces favorable to microbial adhesion and persistence. The clinical consequences of biofilm development are also discussed, particularly with regard to infection persistence, recurrence, and treatment difficulty.

The following chapter is dedicated to antimicrobial resistance (AMR) in ocular infections. This section analyzes the current epidemiological context of AMR, its clinical importance, and the main mechanisms by which bacteria acquire or express resistance to antibiotics. Both phenotypic mechanisms are presented, such as reduced membrane permeability, efflux pumps, target cell modification, and enzymatic inactivation, as well as the main resistance genes involved in resistance to β -lactams (including methicillin), fluoroquinolones, aminoglycosides, and macrolides. In this context, biofilm is also discussed as a structural mechanism of antimicrobial tolerance, with a direct impact on treatment efficacy and on the possibility of infection eradication.

The last chapter of the general part presents the main microbiological diagnostic methods used in ocular infections. Classical methods for bacterial identification and antimicrobial susceptibility testing (AST) are reviewed, as well as molecular methods used for the detection of resistance genes. In addition, the methods used for biofilm detection and assessment are described, including quantitative, qualitative, and imaging methods. This chapter supports the methodological foundation of the original research and justifies the choice of techniques used in the special part of the thesis.

Through this structure, the general part of the thesis provides the theoretical framework necessary for understanding the research presented in the special part and supports the

integrated approach to the topic, at the intersection of medical microbiology and ophthalmology.

Aim and objectives of the thesis

The aim of this doctoral thesis was to evaluate the importance of the biofilm-producing phenotype of bacterial strains involved in ocular surface infections, with emphasis on bacterial conjunctivitis, and to analyze its relationship with antimicrobial resistance, infection persistence, and treatment difficulties.

The thesis was based on the premise that, in bacterial ocular infections, clinical evolution and therapeutic response do not depend exclusively on the identified etiologic agent or on its antibiotic susceptibility under standard laboratory conditions, but also on the ability of microorganisms to adapt and persist in the ocular environment. In this context, biofilm was approached as an important element in understanding the microbiological behavior of bacteria involved in ocular surface infections.

To achieve this aim, several specific objectives were pursued: an updated review of the literature on microbial biofilms developed on contact lenses; etiologic and microbiological characterization of bacterial conjunctivitis in adult and pediatric patients, in both outpatient and inpatient settings; evaluation of the AMR profiles of conjunctival bacterial isolates; investigation of biofilm-forming capacity and analysis of its relationship with the AMR behavior; detection of resistance genes and correlation of these genes with phenotypic resistance profiles and biofilm-forming capacity. In addition, the study aimed to integrate the obtained results into an applied clinical and microbiological perspective relevant to ophthalmic practice.

Through these objectives, the thesis sought to contribute to a better understanding of the relationship between the pathogen, the host, biofilm, and antimicrobial treatment in bacterial ocular infections and to highlight the importance of biofilm as a relevant factor in the microbiological and clinical interpretation of these infections.

Study I - A Comprehensive Review of Microbial Biofilms on Contact Lenses: Challenges and Solutions

The first study included in the doctoral thesis was a narrative and critical review of the scientific literature and aimed to provide a comprehensive analysis of the available data regarding microbial biofilms developed on contact lenses (CL), the microorganisms involved, the mechanisms of persistence, and the clinical implications of this phenomenon. This study

constituted the theoretical foundation of the doctoral research and was published as the following article “*A Comprehensive Review of Microbial Biofilms on Contact Lenses: Challenges and Solutions*”. Its structure was essential for integrating literature data into a coherent and up-to-date framework, relevant from both microbiological and clinical perspectives.

Microbial biofilm represents an organized form of microbial existence, characterized by adhesion to biotic or abiotic surfaces and incorporation into a protective extracellular matrix, mainly composed of extracellular polymeric substances (EPS). This structural organization confers on microorganisms an increased capacity for survival, persistence, and tolerance to hostile conditions, including the presence of antimicrobial agents. In the ophthalmic context, CL represent an abiotic surface favorable to microbial adhesion and colonization, and their use has been repeatedly associated with alteration of the ocular surface microbiota and an increased risk of ocular infections.

The literature analysis showed that wearing CL modifies the ocular microenvironment by altering tear film stability, reducing corneal oxygenation, promoting the accumulation of organic and inorganic deposits, and facilitating prolonged contact between microorganisms and the ocular surface. These changes create favorable conditions for bacterial adhesion and for progression from transient contamination to stable colonization and organization into a mature biofilm that is difficult to eradicate. Thus, CL should not be regarded merely as an optical device, but also as a potential active microbiological substrate involved in the pathogenesis of ocular surface infections.

An important result of this review was the synthesis of data on the microorganisms most frequently involved in CL-associated biofilms. The analyzed literature showed that clinically relevant bacteria include *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Serratia marcescens*, and *Klebsiella pneumoniae*, to which fungi and protozoa may be added in certain clinical settings or in cases of poor hygiene. Among these, *P. aeruginosa* occupies a central place due to its tropism for polymeric surfaces, its high biofilm-forming capacity, and its well-documented role in CL-associated keratitis. In parallel, staphylococci, especially *S. aureus* and *S. epidermidis*, were analyzed as relevant microorganisms due to the frequency of colonization and their persistence on ocular surfaces and medical devices.

The study also synthesized the main stages of biofilm development on CL, namely initial adhesion, irreversible attachment, maturation, and dispersion. Initial adhesion is influenced by the physicochemical characteristics of the lens surface, the composition of the

tear film, and the presence of adsorbed proteins and lipids. Subsequently, microorganisms proliferate and form an organized three-dimensional structure protected by the extracellular matrix, which favors persistence and intercellular exchange. This staging is important not only from a theoretical perspective, but also for identifying the moments at which preventive or therapeutic interventions may be most effective.

Another essential aspect highlighted by this study was the role of biofilm in the development of increased antimicrobial tolerance. The analyzed literature demonstrated that bacteria organized in biofilm can survive exposure to antimicrobial concentrations significantly higher than those required to inhibit planktonic forms. This phenomenon is explained by limited antibiotic penetration through the extracellular matrix, reduced bacterial metabolic activity, development of persistent cells, and differential expression of genes involved in stress response and microbial adaptation. In addition, biofilm facilitates polymicrobial interactions and the exchange of genetic material, including resistance genes, which may contribute to the selection of bacterial populations that are more difficult to treat.

From a clinical perspective, the study showed that CL-associated biofilms are involved in a wide spectrum of ocular complications, ranging from conjunctivitis and inflammatory reactions associated with lens wear to severe bacterial keratitis, potentially threatening vision. The clinical importance of biofilm derives not only from its ability to initiate infection, but also from its role in maintaining persistent, recurrent, or treatment-refractory forms. In this regard, biofilm may explain certain apparently paradoxical therapeutic failures, in which *in vitro* susceptibility of microorganisms does not correlate with clinical response.

The article also addressed the currently available methods for biofilm detection, emphasizing that its identification remains a major methodological challenge. Quantitative and qualitative methods were analyzed, including colorimetric, microscopic, and imaging techniques, as well as their limitations in routine practice. This issue is relevant because the lack of standardized biofilm assessment may lead to underestimation of its role in ocular pathology and in the interpretation of microbiological results.

An important chapter of the study was devoted to current and emerging strategies for the prevention and control of biofilm development on CL. The critical analysis showed that conventional hygiene and disinfection methods, although useful, are not always sufficient to completely prevent microbial colonization and biofilm formation. In this context, new research directions were discussed, including the development of antimicrobial coatings, anti-adhesive surfaces, biomimetic materials, and smart technologies capable of inhibiting bacterial

colonization and organization. These directions are particularly relevant to ophthalmology because they offer real perspectives for reducing the infectious risk associated with CL wear.

Overall, this first study demonstrated that CL-associated microbial biofilm is a major determinant of ocular infectious risk and an essential mechanism of microbial persistence. Its conclusions provided the theoretical basis necessary for the subsequent original studies in the thesis, focused on the clinical, microbiological, and molecular analysis of bacterial conjunctival infections and the biofilm-producing phenotype.

Study II - Comparative Analysis of Bacterial Conjunctivitis in the Adult and Pediatric Inpatient vs. Outpatient Population

The second study had a retrospective, clinical, and microbiological design and aimed to comparatively analyze bacterial conjunctivitis according to patient age and healthcare setting, namely outpatient versus inpatient care. The study was conducted between January 2016 and October 2024 at the “Pius Brînzeu” County Emergency Clinical Hospital in Timișoara and included a total of 126 patients, of whom 76 were adults and 50 were children, diagnosed with conjunctival infections (CI) during inpatient or outpatient care. In the adult group, 55 conjunctival samples from outpatients and 21 from hospitalized patients were analyzed, while in the pediatric group, 6 outpatient samples and 44 samples from hospitalized children were analyzed. In total, 78 isolates were identified in the adult group and 52 bacterial/fungal isolates in the pediatric group. The study was published as the following article: “*Comparative Analysis of Bacterial Conjunctivitis in the Adult and Pediatric Inpatient vs. Outpatient Population*” and aimed primarily to evaluate the etiologic distribution of the bacterial agents involved, their AMR profiles, and the clinical implications of these differences.

Conjunctival samples from adult and pediatric patients, investigated in both outpatient and inpatient settings, were analyzed. The results showed significant differences between these groups, both in terms of etiology and resistance profiles.

The analysis of etiologic distribution showed that, in the outpatient setting, bacterial conjunctivitis was predominantly caused by Gram-positive cocci (GPC), especially staphylococci, reflecting the pattern of community-acquired ocular surface infections. In this context, *Staphylococcus* spp., especially coagulase-negative staphylococci (CoNS) and *S. aureus*, were the most frequently isolated agents, in agreement with the literature data and with the role of conjunctival microbiota in the pathogenesis of these infections.

By contrast, in hospitalized patients, the etiologic distribution was different, being characterized by a higher proportion of Gram-negative bacilli (GNB). Particularly in intensive care units and in Burn Units (BU), isolates belonging to the *Klebsiella*, *Pseudomonas*, and *Acinetobacter* genera were frequently identified, often associated with healthcare-associated infections (HAIs) and more complex resistance profiles. These results suggest that, in the hospital environment, bacterial conjunctivitis may reflect colonization with hospital flora and may be influenced by factors such as prior antibiotic therapy, duration of hospitalization, and patients comorbidities.

Age-group distribution highlighted important particularities. In the pediatric population, bacterial conjunctivitis was frequently caused by *S. aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Haemophilus influenzae*, but a significant proportion of GNB was also observed in hospitalized children, suggesting increased susceptibility to colonization with potentially multidrug-resistant organisms (MDROs). In adults, particularly in the outpatient setting, the predominance of GPC was evident, whereas in hospitalized patients the frequency of GNB increased significantly.

Analysis of AMR profiles revealed important differences between the outpatient and inpatient environments. In adult outpatients, isolates were generally susceptible to antibiotics, although frequent resistance to penicillin and erythromycin was observed among Gram-positive (GP) isolates, along with a moderate frequency of cefoxitin resistance, suggesting the presence of methicillin-resistant (MR) *S. aureus* and CoNS. In contrast, in hospitalized adult patients, the species with the most aggressive resistance behavior were *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*, while among GP bacteria, *S. aureus* isolates with extensive resistance to multiple antibiotic classes were notable. In this subgroup, the combination of different resistance mechanisms led to high percentages of MDR (52.17%) and extensively drug-resistant (XDR) isolates (21.73%). In addition, extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing phenotypes were significantly more frequent in hospitalized adult patients compared with the overall adult cohort and with outpatients.

In the pediatric group, MDR strains were identified in almost one-third of hospitalized patients, mainly due to resistance among GP strains. Multiple AMR phenotypes were observed, including resistance to fluoroquinolones, penicillinase-producing phenotype (PASE), MR, and inducible macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance (MLS_{Bi}), especially in *S. aureus* and *S. pneumoniae*, as well as ESBL-producing *K. pneumoniae*. Although the comparative analysis between hospitalized and outpatient pediatric subgroups did not show statistically significant differences for MDR, ESBL, or methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA)

phenotypes, the results remain clinically important, as they show that strains with therapeutically relevant resistance profiles may also occur in children.

A relevant result of the study was the distribution of acquired resistance phenotypes among the different patient groups. These were more frequently encountered in hospitalized patients than in outpatients, suggesting a major impact of the hospital environment on the selection and dissemination of resistant isolates. Moreover, the analysis showed that certain bacterial isolates identified in conjunctival secretions were also found in other biological samples collected from the same patients, supporting the hypothesis of systemic colonization or infection and highlighting the conjunctiva as a possible microbial reservoir.

Overall, the study demonstrated that the etiology of bacterial conjunctivitis and the AMR profile are significantly influenced by patient age and healthcare setting. In the outpatient setting, GPC, especially staphylococci, predominate, and AMR was generally lower. By contrast, in hospitalized patients, especially critically ill adults from the ICU and BU, CI is more frequently associated with GNB, multiple resistance mechanisms, and MDR/XDR phenotypes, which complicates therapeutic management. These data support the importance of adapting empirical therapy according to the clinical and epidemiological context, as well as the role of antimicrobial stewardship programs in limiting the spread of resistance.

Study III - Genetic Characterization and Biofilm-Forming Capacity of Bacterial Population Isolated from Conjunctival Samples.

The third study represented the central experimental, microbiological, and molecular component of the thesis and aimed to investigate the relationship between biofilm-forming capacity, antimicrobial resistance, and the genetic determinants of resistance in bacterial isolates obtained from conjunctival secretions. This study was published as the following article: *“Genetic Characterization and Biofilm-Forming Capacity of Bacterial Population Isolated from Conjunctival Samples”*.

The study was based on the hypothesis that the biofilm-producing phenotype is a major determinant of persistence in bacterial ocular infections and of suboptimal response to antimicrobial treatment. This hypothesis is supported by data from the literature showing that microorganisms organized in biofilm display a biological behavior different from that of planktonic forms, both in terms of antibiotic tolerance and in their interaction with host defense mechanisms.

To test this hypothesis, conjunctival bacterial isolates were analyzed using conventional microbiological methods for identification and antimicrobial susceptibility testing (AST), complemented by molecular methods for the detection of resistance genes and by experimental methods for quantifying biofilm formation. The study was conducted at the Ophthalmology Clinic of the Timișoara Municipal Emergency Clinical Hospital, between November 2024 and May 2025, and included clinically significant bacterial isolates obtained from conjunctival samples collected from patients with clinical signs of bacterial conjunctivitis, evaluated in both outpatient and inpatient settings.

The results showed that a total of 78 bacterial isolates were analyzed, of which 66 (84.61%) were GPC and 12 (15.38%) were GNB, the difference being statistically significant ($p < 0.001$). This distribution confirmed the predominance of GP bacteria in the conjunctival infectious pathology, while at the same time highlighting the clinical relevance of GNB, even though they were less frequent numerically.

Within the GPC group, CoNS predominated, with 50 isolates, among which *S. epidermidis* was the predominant species (72%, $n = 36$), followed by *S. hominis*, *S. haemolyticus*, and *S. lugdunensis*. Relative to the entire cohort, *S. epidermidis* accounted for 46.15% of the total bacterial isolates and had a significantly higher prevalence compared with *S. aureus* ($p < 0.001$). These findings support the potentially pathogenic role of species often considered part of the conjunctival microbiota, especially in the context of local imbalance and opportunistic infections.

An important objective of the study was the analysis of resistance genes and their correlation with acquired resistance phenotypes. The results showed that isolates carrying resistance genes were more frequent among GPC than among GNB, suggesting a considerable genetic burden of resistance among staphylococci and other GPC involved in conjunctival infections. In GPC, genes associated with β -lactams, including methicillin resistance, such as *blaZ* and *mecA*, were identified, along with other genetic determinants involved in AMR to other antimicrobial classes, depending on species and phenotypic resistance profile. In the GNB group, β -lactamase-type resistance genes were identified in approximately one-third of the isolates (33.33%, $n = 4$), a significantly lower proportion than in GPC ($p = 0.006$). In GNB, genes such as *blaTEM*, *blaCTX-M*, and *blaSHV* were detected, especially in *Escherichia coli*, *K. pneumoniae*, and *H. influenzae* isolates, confirming the presence of clinically and therapeutically relevant resistance mechanisms.

One of the most important components of the study was the evaluation of biofilm-forming capacity. The results demonstrated that a substantial number of conjunctival isolates

were capable of forming biofilm, but the intensity of biofilm formation varied according to taxonomic affiliation and resistance profile. A particularly relevant finding was that GNB displayed, on average, a greater biofilm-forming capacity than GPC, suggesting an increased biological potential for persistence and adaptation in the ocular environment. This issue is clinically important, as it shows that, although less numerous, GNB may have a disproportionately large contribution to infection persistence and difficulty of eradication.

Within GPC, the relationship between AMR and the biofilm-producing phenotype was particularly evident in *Staphylococcus* spp., especially *S. aureus*. The analysis showed that *S. aureus* isolates with acquired resistance profiles had a more pronounced tendency to form biofilm compared with those lacking such mechanisms, suggesting a biologically relevant association between these two phenomena. This observation supports the idea that AMR and biofilm development are not independent processes, but may coexist and potentiate each other, contributing to clinical persistence and difficulty of infection eradication.

Another practically important result was the comparison between bacterial behavior in the planktonic state and that of the same bacteria in the biofilm state. The study demonstrated that biofilm-forming isolates showed significantly increased antimicrobial tolerance compared with planktonic forms. This phenomenon was analyzed especially for amikacin (AK) and levofloxacin (LEV), two antibiotics relevant to ophthalmic practice. The differences observed between planktonic forms and those organized in biofilms, confirmed that susceptibility determined by standard laboratory methods may underestimate the actual behavior of isolates under biological conditions closer to the infectious environment. In other words, some strains that appear susceptible in conventional testing may become significantly more difficult to eradicate when organized in biofilm.

This aspect is clinically essential, as it provides a plausible explanation for certain situations in which antimicrobial treatment appears appropriately chosen based on the standard AST, but the clinical response is incomplete or slow. Therefore, the study results suggest that biofilm should be considered an additional microbiological factor with therapeutic impact, especially in recurrent, persistent, or atypically evolving conjunctivitis.

The results had also an important methodological value, demonstrating the usefulness of an integrated approach combining phenotypic data (AST, biofilm development) with molecular data (resistance genes). This approach allowed a more complete characterization of conjunctival bacterial isolates and provided a deeper perspective on the mechanisms involved in their persistence and antimicrobial tolerance.

Overall, this study demonstrated that the biofilm-producing phenotype is an important microbiological determinant of infection persistence and antimicrobial tolerance, and that its evaluation may provide valuable additional information for the diagnosis and management of bacterial conjunctival infections. The results support the inclusion of biofilm in the clinical and microbiological interpretation of ocular surface infections and underline the need for therapeutic strategies adapted not only to the classical resistance profile, but also to bacterial behavior in biofilm.

General conclusions

The results of this doctoral thesis show that bacterial ocular surface infections, especially bacterial conjunctivitis, should be analyzed in a broader context than that provided by identification of the etiologic agent and the standard results of AST. The integration of clinical, microbiological, and molecular data, together with the evaluation of the biofilm-producing phenotype, allows a more complete understanding of the mechanisms involved in the persistence and evolution of these infections.

The obtained data show that the etiology of bacterial conjunctivitis varies according to the clinical context and patient characteristics. In the outpatient setting, GPC predominate, especially staphylococci, while in hospitalized patients an increase in the frequency of GNB was observed, often associated with more complex resistance profiles and a HAIs context. In addition, in the hospital setting, CI is frequently associated with other bacterial infections, suggesting possible systemic colonization and the role of the conjunctiva as a microbial reservoir. These differences underline the importance of adapting the therapeutic approach to the clinical and epidemiological context.

An important result of the thesis is the demonstration of biofilm-forming capacity in a significant number of conjunctival bacterial isolates. It was observed that, although less numerous, GNB show, on average, a higher biofilm-forming capacity than GPC, suggesting an increased potential for persistence, adaptation, and difficulty of eradication, especially in the hospital environment.

The results also demonstrated the existence of a relationship between the AMR and biofilm-forming capacity, especially in certain *Staphylococcus* species such as *Staphylococcus aureus*. This association suggests that biofilm and AMR are not independent phenomena, but may coexist and potentiate each other, contributing to persistent or recurrent infections and limiting the effectiveness of antimicrobial treatment.

Another relevant issue highlighted by the study is the difference between bacterial behavior in the planktonic state and in the sessile state. Biofilm-forming isolates showed significantly increased antimicrobial tolerance, which may explain situations in which the clinical response does not correlate with standard AST results and highlights the limits of classical susceptibility assessment.

Overall, the results support the importance of integrating the concept of biofilm into the microbiological and clinical interpretation of bacterial ocular infections. Taking this phenomenon into account may contribute to a better understanding of the evolution of these infections, to the identification of cases at risk of persistence or recurrence, and to the optimization of therapeutic strategies through a more nuanced and individualized approach.

Personal contributions

The personal contributions of this doctoral thesis lie in the integrated approach to bacterial ocular surface infections from the perspective of the relationship between biofilm, AMR, and the patient's clinical context, through the correlation of clinical, microbiological, phenotypic, and molecular data.

A first contribution is the development of an updated review of the literature on microbial biofilms formed on CL, in which data regarding growing mechanisms, the microorganisms involved, clinical implications, and prevention and control strategies were synthesized. This analysis provides an overview of a continuously evolving field and highlights the relevance of biofilm development in ophthalmology, especially in relation to the infectious risk associated with ocular device use.

An important contribution of the thesis is the comparative analysis of bacterial conjunctivitis in adult and pediatric patients according to the healthcare setting. The study highlighted relevant differences in terms of etiology and resistance profiles, contributing to a better understanding of the particularities of CI in outpatient and hospital settings. In addition, the results underlined the frequent association of hospital-acquired CI with other bacterial infections and hospital acquired strains, suggesting the role of the conjunctiva as a possible microbial reservoir.

The central original component of the thesis consists in the evaluation of the biofilm-forming capacity of conjunctival bacterial isolates and in the analysis of the relationship between this phenotype, AMR, and the presence of resistance genes. Through the combined use of conventional microbiological methods and molecular methods, it was possible to

achieve a more detailed characterization of the bacterial isolates and of the mechanisms involved in infection persistence.

Another contribution is the demonstration that GNB, although less frequent than GPC, showed on average a higher biofilm-forming capacity, suggesting an increased biological potential for persistence and difficulty of eradication. At the same time, the study highlighted the association between the biofilm-producing phenotype and acquired resistance profiles, especially in certain *Staphylococcus* species.

An important practical contribution of the thesis consists in demonstrating the differences between bacterial behavior in the planktonic state and in the sessile state, with direct implications for the interpretation of AST results and therapeutic management. The obtained results show that susceptibility determined by standard methods may not always reflect the actual behavior of isolates under biological conditions closer to the infectious environment.

By integrating the obtained data, the thesis contributes to the understanding of the role of biofilm in bacterial ocular infections and underlines the need to take this phenomenon into account in microbiological and clinical practice. The results have potential applicability in medical practice by supporting a more nuanced approach to microbiological diagnosis and treatment of ocular surface infections.

Future research directions

The results obtained in this doctoral thesis open several future research directions, with the potential for further development from both microbiological and clinical perspectives.

A first direction of interest is the extension of the analysis to a larger number of bacterial isolates derived from ocular infections, in order to confirm and validate the relationship between biofilm-forming capacity, AMR, and infection persistence in larger and more heterogeneous cohorts.

Another important direction is the further molecular characterization of bacterial isolates involved in ocular surface infections by additional investigation of genes involved both in AMR and in mechanisms of adhesion, colonization, and biofilm formation.

Of particular interest also remains the evaluation of bacterial behavior in biofilm in relation to antimicrobials frequently used in ophthalmology, including the extension of testing to other topically used molecules and the exploration of alternative or complementary therapeutic strategies capable of interfering with biofilm formation or persistence.

An important direction is the development of more standardized and accessible methods for biofilm assessment in routine microbiological practice, so that this phenotype may be more easily integrated into the microbiological interpretation of ocular infections.

At the same time, given the relevance of biofilm involvement in the context of CL use, future research aimed at developing and evaluating materials or adjuvant coating therapies with anti-adhesive and antimicrobial properties is justified, with the goal of reducing the risk of microbial colonization and associated infectious complications.

Therefore, future research directions target not only a deeper understanding of the microbiological mechanisms involved in bacterial ocular infections, but also the identification of solutions with real potential for clinical applicability.

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE

“VICTOR BABEȘ” DIN TIMISOARA

FACULTATEA DE MEDICINĂ

Departamentul IV Microbiologie

Voinescu Elena-Adela



TEZĂ DE DOCTORAT

**IMPORTANȚA FENOTIPULUI PRODUCĂTOR DE BIOFILM AL
TULPINILOR BACTERIENE IMPLICATE ÎN INFECȚIILE DE
SUPRAFAȚĂ OCULARĂ**

R E Z U M A T

Conducător de doctorat:

PROF. UNIV. DR. MUNTEAN DELIA

Timișoara

A N U L 2026

Introducere

Prezenta teză de doctorat este structurată în două părți principale: o parte generală, cu rol teoretic și introductiv, și o parte specială, care cuprinde contribuțiile originale ale cercetării doctorale. Tema lucrării este centrată pe importanța fenotipului producător de biofilm al tulpinilor bacteriene implicate în infecțiile de suprafață oculară și pe relația acestuia cu rezistența la antimicrobiene și persistența infecției.

Alegerea acestei teme a fost determinată de interesul tot mai mare acordat infecțiilor bacteriene oculare în contextul creșterii rezistenței la antimicrobiene și al recunoașterii rolului biofilmului în patogeneza și evoluția acestor infecții. Deși conjunctivita bacteriană este una dintre cele mai frecvente infecții ale suprafeței oculare, datele privind relația dintre caracteristicile microbiologice ale izolatelor bacteriene, capacitatea lor de formare a biofilmului și comportamentul față de antimicrobiene rămân încă limitate, mai ales în context clinic local și regional.

Partea generală

Partea generală a tezei este structurată în cinci capitole și urmărește prezentarea principalelor elemente teoretice necesare înțelegerii temei de cercetare, de la particularitățile suprafeței oculare și ale microbiotei normale, până la mecanismele de patogenitate bacteriană, biofilm, rezistență la antimicrobiene și metodele moderne de diagnostic microbiologic.

Primul capitol este dedicat anatomiei, fiziologiei și microbiologiei suprafeței oculare. În această secțiune sunt prezentate principalele structuri implicate în menținerea integrității și protecției suprafeței oculare, respectiv conjunctiva, corneea, pleoapele și filmul lacrimal. Sunt descrise, de asemenea, mecanismele locale de apărare antiinfecțioasă, inclusiv rolul barierei epiteliale, al clipitului, al filmului lacrimal și al factorilor antimicrobieni prezenți la acest nivel. În același timp, este analizat rolul microbiotei normale oculare, subliniindu-se faptul că suprafața oculară nu reprezintă un mediu steril, ci un ecosistem echilibrat, în care perturbarea relației dintre gazdă și microorganisme poate favoriza colonizarea cu germeni patogeni și apariția infecției.

Cel de-al doilea capitol abordează conjunctivita bacteriană, una dintre cele mai frecvente infecții ale suprafeței oculare. Sunt analizate definiția și clasificarea acestei patologii,

datele epidemiologice disponibile, principalii agenți etiologici implicați, mecanismele patogenice și factorii de risc asociați. În această parte este subliniat faptul că, deși conjunctivita bacteriană este adesea considerată o afecțiune autolimitată, aceasta poate avea expresii clinice și microbiologice diferite în funcție de vârsta pacientului, contextul de îngrijire și profilul microbiologic al tulpinilor implicate. Sunt discutate diferențele dintre infecțiile comunitare și cele asociate asistenței medicale, precum și importanța recunoașterii contextului clinic în alegerea conduitei terapeutice.

Un capitol central al părții generale este reprezentat de biofilmul microbial în infecțiile oculare. În această secțiune sunt prezentate caracteristicile generale ale biofilmului, structura și organizarea acestuia, etapele dezvoltării sale și implicațiile sale în principalele infecții oculare. Este evidențiat faptul că biofilmul reprezintă o formă de organizare microbială care conferă bacteriilor avantaje importante de supraviețuire, inclusiv toleranță crescută la antimicrobiene și la mecanismele de apărare ale gazdei. Un accent aparte este pus pe biofilmul format pe dispozitive oculare, în special pe lentilele de contact, având în vedere rolul acestora ca suprafețe favorabile aderenței și persistenței microbiene. Sunt discutate și consecințele clinice ale biofilmului, în special în ceea ce privește persistența infecției, recurența și dificultatea tratamentului.

Capitolul următor este dedicat rezistenței la antimicrobiene în infecțiile oculare. În această parte sunt analizate contextul epidemiologic actual al rezistenței bacteriene, importanța clinică a acesteia și principalele mecanisme prin care bacteriile dobândesc sau exprimă rezistență la antibiotice. Sunt prezentate atât mecanismele fenotipice, precum reducerea permeabilității membranare, pompele de eflux, modificarea țintei antibioticului sau inactivarea enzimatică, cât și principalele gene de rezistență implicate în rezistența la β -lactamine, fluoroquinolone, aminoglicozide și macrolide. În acest context, biofilmul este discutat și ca mecanism structural de toleranță antimicrobială, cu impact direct asupra eficienței tratamentului și asupra posibilității de eradicare a infecției.

Ultimul capitol al părții generale prezintă metodele de diagnostic microbiologic utilizate în infecțiile oculare. Sunt trecute în revistă metodele clasice de identificare bacteriană și de testare a sensibilității la antimicrobiene (AST), precum și metodele moleculare folosite pentru detectarea genelor de rezistență. De asemenea, sunt descrise metodele utilizate pentru detectarea și evaluarea biofilmului, incluzând metode cantitative, calitative și imagistice. Acest capitol are rolul de a susține fundamentul metodologic al cercetării originale și de a justifica alegerea tehnicilor utilizate în partea specială a tezei.

Prin această structură, partea generală a lucrării oferă cadrul teoretic necesar pentru înțelegerea cercetării prezentate în partea specială și susține abordarea integrată a temei, la intersecția dintre microbiologie medicală și oftalmologie.

Scopul și obiectivele tezei

Scopul prezentei teze de doctorat a fost evaluarea importanței fenotipului producător de biofilm al tulpinilor bacteriene implicate în infecțiile de suprafață oculară, cu accent pe conjunctivita bacteriană, și analiza relației acestuia cu rezistența la antimicrobiene, persistența infecției și dificultatea tratamentului.

Lucrarea a pornit de la premisa că, în infecțiile bacteriene oculare, evoluția clinică și răspunsul terapeutic nu depind exclusiv de agentul etiologic identificat sau de sensibilitatea acestuia la antibiotice în condiții standard de laborator, ci și de capacitatea microorganismelor de a se adapta și persista în mediul ocular. În acest context, biofilmul a fost abordat ca un element important în înțelegerea comportamentului microbiologic al bacteriilor implicate în infecțiile de suprafață oculară.

Pentru atingerea acestui scop, au fost urmărite mai multe obiective specifice: analiza actualizată a literaturii privind biofilmele microbiene dezvoltate pe lentilele de contact; caracterizarea etiologică și microbiologică a conjunctivitei bacteriene la pacienți adulți și copii, în regim de ambulatoriu și spitalizare; evaluarea profilurilor de rezistență la antimicrobiene ale izolatelor bacteriene conjunctivale; investigarea capacității de formare a biofilmului și analiza relației acestuia cu comportamentul de rezistență la antimicrobiene; detectarea unor gene de rezistență și corelarea acestora cu profilurile fenotipice de rezistență și cu capacitatea de formare a biofilmului. Totodată, s-a urmărit integrarea rezultatelor obținute într-o perspectivă clinică și microbiologică aplicabilă, cu relevanță pentru practica oftalmologică.

Prin aceste obiective, teza și-a propus să contribuie la o mai bună înțelegere a relației dintre agentul patogen, gazdă, biofilm și tratamentul antimicrobian în infecțiile oculare bacteriene și să evidențieze importanța biofilmului ca factor relevant în interpretarea microbiologică și clinică a acestor infecții.

Studiul I - Analiza aprofundată a biofilmelor microbiene dezvoltate pe lentilele de contact: provocări și soluții

Primul studiu inclus în teza de doctorat a avut caracter de review narativ și critic al literaturii de specialitate și a urmărit analiza comprehensivă a datelor disponibile privind

biofilmele microbiene dezvoltate pe lentilele de contact (LC), microorganismele implicate, mecanismele de persistență și implicațiile clinice ale acestui fenomen. Acest studiu a constituit fundamentul teoretic al cercetării doctorale și a fost publicat sub forma articolului “A *Comprehensive Review of Microbial Biofilms on Contact Lenses: Challenges and Solutions*”. Structurarea sa a fost esențială pentru integrarea datelor din literatura de specialitate într-un cadru coerent și actualizat, relevant atât din punct de vedere microbiologic, cât și clinic.

Biofilmul microbial reprezintă o formă organizată de existență a microorganismelor, caracterizată prin aderarea acestora la suprafețe biotice sau abiotice și încorporarea lor într-o matrice extracelulară protectoare, alcătuită în principal din substanțe polimerice extracelulare (EPS). Această organizare structurală conferă microorganismelor o capacitate crescută de supraviețuire, persistență și toleranță la condiții ostile, inclusiv în prezența agenților antimicrobieni. În context oftalmologic, LC reprezintă o suprafață abiotică favorabilă aderării și colonizării microbiene, iar utilizarea lor a fost asociată în mod repetat cu alterarea microbiotei suprafeței oculare și cu creșterea riscului de infecții oculare.

Analiza literaturii a evidențiat faptul că purtarea LC modifică microambientul ocular prin alterarea stabilității filmului lacrimal, reducerea oxigenării corneene, acumularea de depozite organice și anorganice și favorizarea contactului prelungit dintre microorganisme și suprafața oculară. Aceste modificări creează condiții favorabile aderării bacteriene și progresiei de la contaminare tranzitorie la colonizare stabilă și organizare într-un biofilm matur, greu de eradicat. Astfel, LC nu trebuie privite doar ca un dispozitiv optic, ci și ca un potențial substrat microbiologic activ, implicat în patogenizarea infecțiilor de suprafață oculară.

Un rezultat important al acestui review a fost sintetizarea datelor privind microorganismele cel mai frecvent implicate în biofilmele asociate LC. Literatura analizată a arătat că dintre bacteriile relevante clinic se remarcă *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Serratia marcescens* și *Klebsiella pneumoniae*, la care se pot adăuga fungi și protozoare în anumite contexte clinice sau de igienă deficitară. Dintre acestea, *P. aeruginosa* ocupă un loc central, datorită tropismului său pentru suprafețele polimerice, capacității crescute de formare a biofilmului și rolului bine documentat în keratita asociată purtării LC. În paralel, stafilococii, în special *S. aureus* și *S. epidermidis*, au fost analizați ca microorganisme relevante prin frecvența colonizării și persistența lor pe suprafețele oculare și pe dispozitivele medicale.

Studiul a sintetizat și principalele etape ale dezvoltării biofilmului pe LC, respectiv aderarea inițială, fixarea ireversibilă, maturarea și dispersia. Aderarea inițială este influențată de caracteristicile fizico-chimice ale suprafeței lentilei, de compoziția filmului lacrimal și de

prezența proteinelor și lipidelor adsorbite. Ulterior, microorganismele proliferază și formează o structură tridimensională organizată, protejată de matricea extracelulară, care favorizează persistența și schimburile intercelulare. Această etapizare este importantă nu doar din punct de vedere teoretic, ci și pentru identificarea momentelor în care intervențiile preventive sau terapeutice ar putea fi cele mai eficiente.

Un alt aspect esențial evidențiat de acest studiu a fost rolul biofilmului în apariția toleranței crescute la antimicrobiene. Literatura analizată a demonstrat că bacteriile organizate în biofilm pot supraviețui expunerii la concentrații antimicrobiene semnificativ mai mari decât cele necesare pentru inhibarea formelor planktonice. Acest fenomen este explicat prin penetrarea limitată a antibioticelor prin matricea extracelulară, reducerea activității metabolice a bacteriilor, formarea celulelor persistente și expresia diferențiată a unor gene implicate în răspunsul la stres și în adaptarea microbiană. În plus, biofilmul facilitează interacțiunile polimicrobiene și schimbul de material genetic, inclusiv gene de rezistență, ceea ce poate contribui la selecția unor populații bacteriene mai greu de tratat.

Din punct de vedere clinic, studiul a evidențiat faptul că biofilmele dezvoltate pe LC sunt implicate într-un spectru larg de complicații oculare, de la conjunctivite și reacții inflamatorii asociate purtării lentilelor până la keratite bacteriene severe, potențial amenințătoare de vedere. Importanța clinică a biofilmului nu derivă doar din capacitatea sa de a iniția infecția, ci și din rolul în menținerea formelor persistente, recurente sau refractare la tratamentul convențional. În acest sens, biofilmul poate explica anumite eșecuri terapeutice aparent paradoxale, în care sensibilitatea *in vitro* a microorganismelor nu se corelează cu răspunsul clinic.

Articolul a abordat și metodele disponibile pentru detectarea biofilmului, subliniind faptul că identificarea sa rămâne o provocare metodologică importantă. Au fost analizate metode cantitative și calitative, inclusiv tehnici colorimetrice, microscopice și imagistice, precum și limitele acestora în practica de rutină. Acest aspect este relevant deoarece lipsa unei evaluări standardizate a biofilmului poate conduce la subestimarea rolului său în patologia oculară și în interpretarea rezultatelor microbiologice.

Un capitol important al studiului a fost dedicat strategiilor actuale și emergente de prevenție și control al biofilmului pe LC. Analiza critică a arătat că metodele convenționale de igienă și dezinfectare, deși utile, nu sunt întotdeauna suficiente pentru prevenirea completă a colonizării microbiene și a formării biofilmului. În acest context, au fost discutate noile direcții de cercetare, inclusiv dezvoltarea de acoperiri antimicrobiene, suprafețe antiaderente, materiale biomimetice și tehnologii inteligente capabile să inhibe colonizarea și organizarea

bacteriană. Aceste direcții au o relevanță deosebită pentru oftalmologie, deoarece oferă perspective reale pentru reducerea riscului infecțios asociat purtării LC.

În ansamblu, acest prim studiu a demonstrat că biofilmul microbial asociat LC reprezintă un determinant major al riscului infecțios ocular și un mecanism esențial de persistență microbială. Concluziile sale au oferit suportul teoretic necesar pentru studiile originale ulterioare din teză, orientate către analiza clinică, microbiologică și moleculară a infecțiilor conjunctivale bacteriene și a fenotipului producător de biofilm.

Studiul II - Analiza comparativă a conjunctivitei bacteriene la populația adultă și pediatrică, în regim de spitalizare și ambulatoriu

Cel de-al doilea studiu a avut un caracter retrospectiv, clinic și microbiologic și a urmărit analiza comparativă a conjunctivitei bacteriene în funcție de vârsta pacientului și de contextul de îngrijire medicală, respectiv ambulatoriu versus spitalizare. Studiul a fost realizat în perioada ianuarie 2016 – octombrie 2024, în cadrul Spitalului Clinic Județean de Urgență „Pius Brînzeu” Timișoara, și a inclus un total de 126 de pacienți, dintre care 76 adulți și 50 copii, diagnosticați cu infecții conjunctivale (IC) în timpul îngrijirii în regim de spitalizare sau în ambulatoriu. În grupul adulților au fost analizate 55 de probe conjunctivale provenite din ambulatoriu și 21 de la pacienți internați, iar în grupul pediatric au fost analizate 6 probe din ambulatoriu și 44 de la copii internați. În total, în grupul adulților au fost identificate 78 de izolate, iar în grupul pediatric 52 de izolate bacteriene/fungice. Studiul a fost publicat sub forma articolului *“Comparative Analysis of Bacterial Conjunctivitis in the Adult and Pediatric Inpatient vs. Outpatient Population”* și a avut ca obiectiv principal evaluarea distribuției etiologice a agenților bacterieni implicați, a profilurilor de rezistență la antimicrobiene și a implicațiilor clinice ale acestor diferențe.

În cadrul studiului au fost analizate probe conjunctivale provenite de la pacienți adulți și copii, investigați atât în regim ambulator, cât și în regim de spitalizare. Rezultatele au evidențiat diferențe semnificative între aceste grupuri, atât din punct de vedere etiologic, cât și al profilurilor de rezistență.

Analiza distribuției etiologice a arătat că, în ambulatoriu, conjunctivitele bacteriene au fost cauzate predominant de cocci Gram-pozitivi (CGP), în special stafilococi, ceea ce reflectă tiparul infecțiilor comunitare ale suprafeței oculare. În acest context, *Staphylococcus* spp., în special SCN și *S. aureus*, au fost cei mai frecvenți agenți izolați, în concordanță cu datele din literatură și cu rolul microbiotei conjunctivale în patogenizarea acestor infecții.

În schimb, la pacienții spitalizați, distribuția etiologică a fost diferită, fiind caracterizată printr-o pondere mai mare a bacililor Gram-negativi (BGN). În special în secțiile de terapie intensivă și în Unitățile Funcționale de Arși (UFA), au fost identificate frecvent tulpini aparținând genurilor *Klebsiella*, *Pseudomonas* și *Acinetobacter*, adesea asociate cu IAAM și cu profiluri de rezistență mai complexe. Aceste rezultate sugerează că, în mediul spitalicesc, conjunctivita bacteriană poate reflecta colonizarea cu flora nosocomială și poate fi influențată de factori precum antibioterapia anterioară, durata internării și comorbiditățile pacientului.

Distribuția pe grupe de vârstă a evidențiat particularități importante. La populația pediatrică, conjunctivita bacteriană a fost determinată frecvent de *S. aureus*, *Streptococcus pneumoniae* și *Haemophilus influenzae*, însă la copiii spitalizați a fost observată și o proporție semnificativă de BGN, sugerând o susceptibilitate crescută la colonizarea cu germeni potențial multirezistenți. La adulți, în special în ambulatoriu, predominanța CGP a fost evidentă, în timp ce la pacienții internați a crescut semnificativ frecvența BGN.

Analiza profilurilor de rezistență la antimicrobiene a evidențiat diferențe importante între mediul ambulator și cel spitalicesc. La pacienții adulți din ambulatoriu, izolatele au fost, în general, sensibile la antibiotice, deși a fost observată rezistență frecventă la penicilină și eritromicină în rândul izolatelor Gram-pozitive (GP), precum și o frecvență moderată a rezistenței la cefoxitină, sugerând prezența unor tulpini metilino-rezistente (MR) de *S. aureus* și a unor stafilococi coagulazo-negativi (SCN). În schimb, la pacienții adulți internați, speciile cu cel mai agresiv comportament de rezistență au fost *Acinetobacter baumannii* și *Pseudomonas aeruginosa*, iar dintre bacteriile GP s-au remarcat izolatele de *S. aureus* cu rezistență extinsă la multiple clase de antibiotice. În acest subgrup, asocierea diferitelor mecanisme de rezistență a condus la procente ridicate de tulpini multirezistente (MDR) (52,17%) și extensiv rezistente (XDR) (21,73%). De asemenea, fenotipurile producătoare de beta-lactamaze cu spectru extins (ESBL) au fost semnificativ mai frecvente la pacienții adulți internați comparativ cu întregul lot adult și cu pacienții din ambulatoriu.

În grupul pediatric, tulpinile MDR au fost identificate la aproape o treime dintre pacienții spitalizați, în special ca urmare a rezistenței tulpinilor GP. S-au remarcat fenotipuri multiple de rezistență la antimicrobiene (AMR), incluzând rezistență la fluorochinolone, fenotip producător de penicilază (PAZA), MR și MLSBi, în special la *S. aureus* și *S. pneumoniae*, precum și tulpini de *K. pneumoniae* producătoare de ESBL. Deși analiza comparativă dintre subgrupurile pediatrice internate și cele din ambulatoriu nu a evidențiat diferențe semnificative statistice pentru fenotipurile MDR, ESBL sau metilino-rezistente de *S. aureus* (MRSA), rezultatele

rămân importante din punct de vedere clinic, deoarece arată că și la copil pot fi întâlnite tulpini cu profil de rezistență relevant terapeutic.

Un rezultat relevant al studiului a fost distribuția fenotipurilor de rezistență dobândită între diferitele grupuri de pacienți. Acestea au fost mai frecvent întâlnite în rândul pacienților spitalizați comparativ cu cei din ambulatoriu, sugerând un impact important al mediului nosocomial asupra selecției și diseminării tulpinilor rezistente. De asemenea, analiza a evidențiat că anumite tulpini bacteriene identificate în secrețiile conjunctivale au fost regăsite și în alte tipuri de probe biologice recoltate de la aceiași pacienți, ceea ce susține ipoteza unei colonizări sau infecții sistemice și subliniază rolul conjunctivei ca posibil rezervor microbian.

În ansamblu, studiul a demonstrat că etiologia conjunctivitei bacteriene și profilul de rezistență la antimicrobiene sunt influențate semnificativ de vârsta pacientului și de contextul de îngrijire medicală. În ambulatoriu predomină CGP, în special stafilococii, iar rezistența la antimicrobiene este, în general, mai redusă. În schimb, la pacienții spitalizați, mai ales la cei adulți critici din ATI și UFA, IC este asociată mai frecvent cu BGN, multiple mecanisme de rezistență și fenotipuri MDR/XDR, ceea ce complică managementul terapeutic. Aceste date susțin importanța adaptării terapiei empirice în funcție de contextul clinic și epidemiologic, precum și rolul programelor de stewardship antimicrobian în limitarea răspândirii rezistenței.

Studiul III - Caracterizarea genetică și evaluarea capacității de formare a biofilmului la populația bacteriană izolată din secreții conjunctivale

Cel de-al treilea studiu a reprezentat componenta experimentală, microbiologică și moleculară centrală a tezei și a avut ca obiectiv investigarea relației dintre capacitatea de formare a biofilmului, rezistența la antimicrobiene și determinismul genetic al rezistenței la izolate bacteriene obținute din secreții conjunctivale. Acest studiu a fost publicat sub forma articolului "*Genetic Characterization and Biofilm-Forming Capacity of Bacterial Population Isolated from Conjunctival Samples*".

Studiul a pornit de la ipoteza că fenotipul producător de biofilm reprezintă un determinant major al persistenței infecțiilor bacteriene oculare și al răspunsului suboptimal la tratamentul antimicrobian. Această ipoteză este susținută de datele din literatură care arată că microorganismele organizate în biofilm prezintă un comportament biologic diferit de cel al formelor planktonice, atât în ceea ce privește toleranța la antibiotice, cât și interacțiunea cu mecanismele de apărare ale gazdei.

Pentru testarea acestei ipoteze, au fost analizate izolate bacteriene conjunctivale utilizând metode microbiologice convenționale de identificare și testare a sensibilității la antimicrobiene (AST), completate de metode moleculare pentru detectarea unor gene de rezistență și de metode experimentale pentru cuantificarea formării biofilmului. Studiul a fost realizat în cadrul Clinicii de Oftalmologie a Spitalului Clinic Municipal de Urgență Timișoara, în perioada noiembrie 2024 – mai 2025, și a inclus izolate bacteriene considerate clinic semnificative, provenite din secreții conjunctivale recoltate de la pacienți cu semne clinice de conjunctivită bacteriană, evaluați atât în regim de ambulatoriu, cât și de spitalizare.

Rezultatele au arătat că au fost analizate în total 78 de izolate bacteriene, dintre care 66 (84,61%) au fost CGP, iar 12 (15,38%) BGN, diferența fiind semnificativă statistic ($p < 0,001$). Această distribuție a confirmat predominanța bacteriilor GP în patologia conjunctivală bacteriană, dar a evidențiat în același timp și relevanța clinică a BGN, chiar dacă aceștia au fost numeric mai puțin frecvenți.

În cadrul CGP, grupul dominant a fost reprezentat de SCN, cu 50 de izolate, iar dintre aceștia *S. epidermidis* a fost specia predominantă (72%, $n = 36$), urmată de *S. hominis*, *S. haemolyticus* și *S. lugdunensis*. Raportat la întreg lotul, *S. epidermidis* a reprezentat 46,15% din totalul izolatelor bacteriene și a avut o prevalență semnificativ mai mare comparativ cu *S. aureus* ($p < 0,001$). Aceste rezultate susțin rolul potențial patogen al unor specii frecvent considerate parte a microbiotei conjunctivale, în special în contextul dezechilibrului local și al infecțiilor oportuniste.

Un obiectiv important al studiului a fost analiza genelor de rezistență și corelarea acestora cu fenotipurile de rezistență dobândită. Rezultatele au arătat că izolatele purtătoare de gene de rezistență au fost mai frecvente în rândul CGP decât al BGN, ceea ce sugerează o încărcare genetică importantă a rezistenței în rândul stafilococilor și altor CGP implicați în infecțiile conjunctivale. La CGP au fost identificate gene asociate rezistenței la β -lactamine, inclusiv la meticilină, precum *blaZ* și *mecA*, dar și alte determinante genetice implicate în rezistența la alte clase de antimicrobiene, în funcție de specie și de profilul fenotipic de rezistență. În lotul de BGN, genele de rezistență de tip β -lactamază au fost identificate la aproximativ o treime dintre izolate (33,33%, $n = 4$), proporție semnificativ mai mică decât în cazul CGP ($p = 0,006$). La BGN au fost detectate gene precum *blaTEM*, *blaCTX-M* și *blaSHV*, în special la izolate de *Escherichia coli*, *K. pneumoniae* și *H. influenzae*, confirmând prezența unor mecanisme de rezistență cu relevanță clinică și terapeutică importantă.

Una dintre cele mai importante componente ale studiului a fost evaluarea capacității de formare a biofilmului. Rezultatele au demonstrat că un număr important de izolate

conjunctivale au fost capabile să formeze biofilm, însă intensitatea formării biofilmului a variat în funcție de apartenența taxonomică și de profilul de rezistență. Un rezultat deosebit de relevant a fost faptul că BGN au prezentat, în medie, o capacitate mai mare de formare a biofilmului comparativ cu CGP, sugerând un potențial biologic crescut de persistență și adaptare la mediul ocular. Acest aspect este important din punct de vedere clinic, deoarece arată că, deși mai puțin numeroși, BGN pot avea o contribuție disproporționat de mare la persistența infecției și la dificultatea eradicării acesteia.

În cadrul CGP, relația dintre rezistența la antimicrobiene și fenotipul producător de biofilm a fost deosebit de evidentă în cazul speciilor de *Staphylococcus*, în special *S. aureus*. Analiza a arătat că izolatele de *S. aureus* cu profil de rezistență dobândită au avut o tendință mai accentuată de a forma biofilm comparativ cu cele fără astfel de mecanisme, sugerând o asociere biologic relevantă între cele două fenomene. Această observație susține ideea că rezistența la antimicrobiene și formarea biofilmului nu reprezintă procese independente, ci pot coexista și se potența reciproc, contribuind la persistența clinică și la dificultatea eradicării infecției.

Un alt rezultat cu valoare practică majoră a fost reprezentat de comparația dintre comportamentul la antibiotice al bacteriilor în stare planktonică și al acelorași bacterii în stare de biofilm. Studiul a demonstrat că izolatele capabile să formeze biofilm au prezentat o toleranță semnificativ crescută la antimicrobiene comparativ cu formele planktonice. Acest fenomen a fost analizat în special pentru amikacină (AK) și levofloxacină (LEV), două antibiotice relevante pentru practica oftalmologică. Diferențele observate între formele planktonice și cele organizate în biofilm au confirmat faptul că sensibilitatea determinată prin metode standard de laborator poate subestima comportamentul real al izolatelor în condiții biologice mai apropiate de mediul infecțios. Cu alte cuvinte, unele tulpini aparent sensibile în testarea convențională pot deveni semnificativ mai dificil de eradicat atunci când sunt organizate în biofilm.

Acest aspect este esențial din perspectivă clinică, deoarece oferă o explicație plauzibilă pentru anumite situații în care tratamentul antimicrobian pare corect ales pe baza antibiogrammei standard, dar răspunsul clinic este incomplet sau lent. Prin urmare, rezultatele studiului sugerează că biofilmul trebuie considerat un factor microbiologic suplimentar cu impact terapeutic, mai ales în cazurile de conjunctivită recurentă, persistentă sau cu evoluție atipică.

Rezultatele obținute au avut și o valoare metodologică importantă, demonstrând utilitatea unei abordări integrate care combină date fenotipice (AST, biofilm) cu date

moleculare (gene de rezistență). Această abordare a permis o caracterizare mai completă a izolatelor bacteriene conjunctivale și a oferit o perspectivă mai profundă asupra mecanismelor implicate în persistența și toleranța antimicrobiană a acestora.

În ansamblu, acest studiu a demonstrat că fenotipul producător de biofilm reprezintă un determinant microbiologic important al persistenței infecției și al toleranței la antimicrobiene, iar evaluarea sa poate aduce informații suplimentare valoroase în diagnosticul și managementul infecțiilor conjunctivale bacteriene. Rezultatele susțin includerea biofilmului în interpretarea clinică și microbiologică a infecțiilor de suprafață oculară și subliniază necesitatea unor strategii terapeutice adaptate nu doar profilului clasic de rezistență, ci și comportamentului bacterian în biofilm.

Concluzii generale

Rezultatele prezentei teze de doctorat evidențiază faptul că infecțiile bacteriene ale suprafeței oculare, în special conjunctivita bacteriană, trebuie analizate într-un context mai larg decât cel oferit de identificarea agentului etiologic și de rezultatele standard ale AST. Integrarea datelor clinice, microbiologice și moleculare, alături de evaluarea fenotipului producător de biofilm, permite o înțelegere mai completă a mecanismelor implicate în persistența și evoluția acestor infecții.

Datele obținute arată că etiologia conjunctivitei bacteriene variază în funcție de contextul clinic și de caracteristicile pacientului. În ambulatoriu predomină CGP, în special stafilococii, în timp ce la pacienții spitalizați se observă o creștere a frecvenței BGN, adesea asociați cu profile de rezistență mai complexe și cu context nosocomial. În plus, în mediul spitalicesc, IC se asociază frecvent cu alte infecții bacteriene, sugerând posibilitatea unei colonizări sistemice și rolul conjunctivei ca rezervor microbial. Aceste diferențe subliniază importanța adaptării conduitei terapeutice la contextul clinic și epidemiologic.

Un rezultat important al tezei este evidențierea capacității de formare a biofilmului la un număr semnificativ de izolate bacteriene conjunctivale. S-a observat că, deși mai puțin numeroși, BGN prezintă, în medie, o capacitate mai mare de formare a biofilmului comparativ cu CGP, ceea ce sugerează un potențial crescut de persistență, adaptare și dificultate în eradicare, în special în mediul spitalicesc.

De asemenea, rezultatele au demonstrat existența unei relații între rezistența la antimicrobiene și capacitatea de formare a biofilmului, în special în cazul unor specii de *Staphylococcus*, precum *Staphylococcus aureus*. Această asocieră sugerează că biofilmul

și rezistența la antimicrobiene (AMR) nu sunt fenomene independente, ci pot coexista și se potența reciproc, contribuind la evoluția persistentă sau recurentă a infecției și la limitarea eficienței tratamentului antimicrobian.

Un alt aspect relevant evidențiat de studiu este diferența dintre comportamentul bacteriilor în stare planktonică și în stare sesilă. Izolatele capabile să formeze biofilm au prezentat o toleranță semnificativ crescută la antimicrobiene, ceea ce poate explica situațiile în care răspunsul clinic nu este concordant cu rezultatele antibiogramei standard și subliniază limitele evaluării clasice a sensibilității bacteriene.

În ansamblu, rezultatele susțin importanța integrării conceptului de biofilm în interpretarea microbiologică și clinică a infecțiilor oculare bacteriene. Luarea în considerare a acestui fenomen poate contribui la o mai bună înțelegere a evoluției acestor infecții, la identificarea cazurilor cu risc de persistență sau recurență și la optimizarea strategiilor terapeutice, printr-o abordare mai nuanțată și individualizată.

Contribuții personale

Contribuțiile personale ale prezentei teze de doctorat constau în abordarea integrată a infecțiilor bacteriene de suprafață oculară din perspectiva relației dintre biofilm, AMR și contextul clinic al pacientului, prin corelarea datelor clinice, microbiologice, fenotipice și moleculare.

Un prim element de contribuție îl reprezintă realizarea unui review actualizat al literaturii privind biofilmele microbiene dezvoltate pe LC, în care au fost sintetizate date referitoare la mecanismele de formare, microorganismele implicate, implicațiile clinice și strategiile de prevenție și control. Această analiză oferă o imagine de ansamblu asupra unui domeniu aflat în continuă dezvoltare și evidențiază relevanța biofilmului în oftalmologie, în special în raport cu riscul infecțios asociat utilizării dispozitivelor oculare.

O contribuție importantă a tezei este reprezentată de analiza comparativă a conjunctivitei bacteriene la pacienți adulți și copii, în funcție de contextul de îngrijire. Studiul a evidențiat diferențe relevante din punct de vedere etiologic și al profilurilor de rezistență, contribuind la o mai bună înțelegere a particularităților IC în mediul ambulator și spitalicesc. În plus, rezultatele au subliniat asocierea frecventă a IC din mediul spitalicesc cu alte infecții bacteriene și cu tulpini nosocomiale, sugerând rolul conjunctivei ca posibil rezervor microbial.

Componenta originală centrală a tezei constă în evaluarea capacității de formare a biofilmului la izolate bacteriene conjunctivale și în analiza relației dintre acest fenotip,

rezistența la antimicrobiene și prezența unor gene de rezistență. Prin utilizarea combinată a metodelor microbiologice convenționale și a metodelor moleculare, a fost posibilă o caracterizare mai detaliată a izolatelor bacteriene și a mecanismelor implicate în persistența infecției.

Un alt element de contribuție îl reprezintă evidențierea faptului că BGN, deși mai puțin frecvenți decât CGP, au prezentat în medie o capacitate mai mare de formare a biofilmului, sugerând un potențial biologic crescut de persistență și dificultate în eradicare. Totodată, studiul a evidențiat asocierea dintre fenotipul producător de biofilm și profilurile de rezistență dobândită, în special în cazul unor specii de *Staphylococcus*.

O contribuție practică importantă a tezei constă în demonstrarea diferențelor dintre comportamentul bacteriilor în stare planktonică și în stare sesilă, cu implicații directe asupra interpretării rezultatelor AST și asupra conduitei terapeutice. Rezultatele obținute arată că sensibilitatea determinată prin metode standard poate să nu reflecte întotdeauna comportamentul real al izolatelor în condiții biologice mai apropiate de mediul infecțios.

Prin integrarea datelor obținute, teza aduce o contribuție la înțelegerea rolului biofilmului în infecțiile bacteriene oculare și subliniază necesitatea luării în considerare a acestui fenomen în practica microbiologică și clinică. Rezultatele obținute au potențial de aplicabilitate în practica medicală, prin susținerea unei abordări mai nuanțate a diagnosticului microbiologic și a tratamentului infecțiilor de suprafață oculară.

Direcții viitoare de cercetare

Rezultatele obținute în cadrul prezentei teze de doctorat deschid mai multe direcții viitoare de cercetare, cu potențial de aprofundare atât din perspectivă microbiologică, cât și clinică.

O primă direcție de interes o reprezintă extinderea analizei asupra unui număr mai mare de izolate bacteriene provenite din infecții oculare, pentru a confirma și valida relația dintre capacitatea de formare a biofilmului, rezistența la antimicrobiene și persistența infecției în loturi mai largi și mai heterogene.

O altă direcție importantă constă în aprofundarea caracterizării moleculare a tulpinilor bacteriene implicate în infecțiile de suprafață oculară, prin investigarea suplimentară a genelor implicate atât în rezistența la antimicrobiene, cât și în mecanismele de aderare, colonizare și formare a biofilmului.

De interes deosebit rămâne și evaluarea comportamentului bacterian în biofilm în raport cu antimicrobienele utilizate frecvent în oftalmologie, inclusiv prin extinderea testării către alte molecule cu utilizare topică și prin explorarea unor strategii terapeutice alternative sau complementare, capabile să interfereze cu formarea sau persistența biofilmului.

O direcție importantă este reprezentată de dezvoltarea unor metode standardizate și mai accesibile pentru evaluarea biofilmului în practica microbiologică de rutină, astfel încât acest fenotip să poată fi integrat mai ușor în interpretarea microbiologică a infecțiilor oculare.

Totodată, având în vedere relevanța implicării biofilmului în contextul utilizării LC, sunt justificate cercetări viitoare orientate către dezvoltarea și evaluarea unor materiale sau terapii adjuvante de acoperire cu proprietăți antiaderente și antimicrobiene, cu scopul reducerii riscului de colonizare microbiană și al complicațiilor infecțioase asociate.

Prin urmare, direcțiile viitoare de cercetare vizează nu doar aprofundarea mecanismelor microbiologice implicate în infecțiile bacteriene oculare, ci și identificarea unor soluții cu potențial real de aplicabilitate clinică.