

**“VICTOR BABEȘ” UNIVERSITY OF MEDICINE AND PHARMACY FROM
TIMISOARA**

FACULTY OF MEDICINE

Department XIV MICROBIOLOGY

MUȘUROI SILVIA-IOANA



PHD THESIS

**BIOFILM-FORMING BACTERIA IN CHRONIC NON-HEALING
WOUND INFECTIONS: OPTIMIZATION STRATEGIES FOR
MICROBIOLOGICAL DIAGNOSIS AND ANTIMICROBIAL
RESISTANCE MANAGEMENT**

A B S T R A C T

Scientific Coordinator:

A PROF. UNIV.DR. HABIL. MUNTEAN DELIA

Timișoara

2026

ABSTRACT

The term “chronic wound” is a general concept used to describe the heterogeneous group of chronic skin lesions that differ in etiology, pathogenesis, size, location, and evolution, but share a common characteristic – the inability to heal within a normal physiological timeframe. In the present doctoral research, the terms “chronic wound” and “wound exudate” were used in their broad sense, as previously defined.

There is growing recognition that biofilms are present in the majority of chronic non-healing wounds, with some studies reporting frequencies exceeding 78%. It is increasingly emphasized that microbiological investigations of chronic wounds have limited diagnostic performance, as they provide only partial identification of infectious agents if a time interval exceeds 24 hours. Several studies have described patterns of microbial population diversity in chronic wounds and introduced the concept of functionally equivalent pathogroups (FEPs). At the same time, research has demonstrated that traditional culture-based diagnostic methods may be strongly influenced by various factors leading to selective diagnostic results. Consequently, these authors suggest that the use of high-resolution molecular diagnostic methods, such as bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing (bTEFAP), could be useful for the diagnosis of infections associated with chronic non-healing wounds.

The present doctoral research aimed to investigate the antimicrobial resistance genes and biofilm formation capacities of bacterial isolates from chronic wounds of patients from the departments of the “Pius Brinzeu” County Emergency Hospital Timisoara (SCJUPBT). The species were selected based on the results of previous studies. It also aimed to highlight the need for a personalized therapeutic approach to chronic wounds, taking into account the mechanisms underlying treatment resistance. These mechanisms refer to bacterial factors (such as the portage of resistance genes and the capacity to form biofilm), to factors related to the wound microenvironment (colonized by biofilm) and to the relative contribution of the specificity of the overall resistance profile.

The general part of the doctoral thesis summarizes the current information from the specialized literature on the issue of chronic wounds associated with bacterial biofilm. The theoretical chapters addressed the following topics: Pathophysiology of wound healing (C1),

Wound microbiology (C2), Bacterial biofilm in chronic wounds (C3), Diagnostic methods (C4), Antibiotic treatment of biofilm infection (C5) and Biofilm study methods (C6).

In this last chapter and later in chapter 10, the biofilm study methods used are presented, some of which are cultivation on Calgary biofilm plates and antimicrobial susceptibility testing, which constitutes a new diagnostic method introduced with this research into the practice of our laboratory.

The special part of the thesis consists of four chapters in which the research activity carried out is described. This highlighted the importance of infections in chronic non-healing wounds in current medical practice regarding their incidence, the impact on patients (hospitalization, treatment, quality of life) and the predominant incidence of biofilm-forming bacteria in these wounds. The importance of the biofilm-forming character of bacteria in the unfavourable evolution of the wound healing process was also demonstrated, respectively the importance of innovative therapeutic approaches, in-depth in this regard, in view of a successful treatment outcome. The first chapter of this part (C7) entitled “The clinical context of chronic wound infections”, is an introductory part of the research activity of the three studies presented later.

Chapter 8 (C8) entitled “Infectious Pathology in Emergency Medicine, Incidence and Importance of Wound Infections” showcases the first research, which was carried out within the Emergency Department (ED) of SCJUPBT, over a period of 6 months. The participation of ED patients in the study was based on inclusion/exclusion criteria that defined infections as community-acquired (CAI). Samples were taken as much as possible before the administration of antibiotics and the identification of pathogens, the antibiogram and the determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) were performed according to the protocols of the Microbiology Department of the Clinical Laboratory of Medical Analysis. The results of the study highlighted important phenomena regarding the activity in the ED, related to the patients, the collected samples and the isolated strains.

During the study period there were 25676 patients presented to the ED service, of which 7661 (29.83%) were admitted through the emergency service. The total number of people admitted to SCJUPB was 12777, thus patients admitted through the ED represented 59.96% of the total number of admissions. The assessment of the share of transfer departments of ED admissions showed that the most requested specialties were Surgery, Neurology and Gastroenterology. From the group of 7661 ED patients, 657 (8.57%) were

diagnosed with community-acquired infections (CAIs) causing the admission disease or associated with it, highlighting their impact on the infectious pathology within the hospital. ED patients with an infectious diagnosis represented 37.69% of the total number of patients with infections (1743) admitted during this period.

Regarding the study of DU-ICA infections, it was carried out on 767 biological samples, that were collected from the 657 DU-ICA patients, in order to perform the bacteriological diagnosis. The most numerous samples were urine cultures, wound secretions and blood cultures. Of the 767 samples analysed, 903 microbial isolates were identified, of which 48.95% were Enterobacterales species, 10.08% non-fermentative Gram-negative bacilli (BGN), 34.22% Gram-positive cocci (GPC) and 4.98% fungi.

Gram-negative bacteria from the Enterobacterales family were predominant. *E. Coli* emerged as the dominant species (approx. 25%), followed by *Klebsiella spp.* and *S. aureus*. The distribution of these microorganisms, especially in wound secretions and urine culture samples, highlights the importance of these pathologies in the overall community infections studied.

In the case of wound secretion samples, there were identified, predominantly, Gram-negative isolates belonging to the species *Pseudomonas spp.* and *Acinetobacter spp.* along with *S. aureus* among the gram-positive species. The importance of identifying these microorganisms lies in their increased ability to form biofilms and the high level of antimicrobial resistance, characteristics that favour the persistence of the infection, the chronicity of the lesions and subsequent therapeutic difficulties. *E. coli* isolates were identified mainly in urinary tract infections (approximately 50% of urine cultures) and *Klebsiella spp.* strains were frequently isolated in respiratory tract secretions and urine.

Regarding antimicrobial resistance, a high level of resistance was observed both in the case of the isolates predominant in wounds and in the case of the strains identified in other types of samples. Thus *Pseudomonas spp.* demonstrated significant antimicrobial resistance, with relevant proportions of MDR and DTR. *Acinetobacter spp.* strains in the study expressed the highest level of resistance, defining the MDR, DTR and XDR phenotypes. *S. aureus* was characterized by an increased frequency of MRSA and MDR strains. *E. coli* strains showed moderate resistance, described by the presence of the microbiological phenotypes of the BLSE SXT, FQ and the epidemiological phenotype MDR. For *K. pneumoniae* isolates,

antimicrobial resistance demonstrated the presence of the BLSE, CRE and MDR, DTR and XDR phenotypes.

The results obtained suggest the existence of complex microbiological mechanisms involved in the persistence of infections and in the possibility of bacterial biofilm development, thus demonstrating the need for an integrated diagnostic and therapeutic approach. In this regard, the study highlighted the importance of implementing rapid diagnostic methods in the Emergency Department, where the frequent use of antibiotic therapy favours the selection of resistant microorganisms. Rapid molecular tests (PCR) and biomarkers facilitate early and appropriate initiation of antibiotic therapy and reduce unnecessary use of antibiotics. As a result, the association of this type of rapid testing with conventional culture methods can optimize the antimicrobial management of patients with wound infections and other community-acquired infections.

The second research was included in chapter 9 (C9) entitled "Profile of bacterial infections in a burn unit during and after the Covid-19 pandemic". The study aimed to investigate the differences in the etiology, type of infected sample and antimicrobial resistance profile of bacterial strains isolated in samples of burn patients hospitalized in the Burns Functional Unit of SCJUPBT, during the COVID-19 pandemic and post-pandemic; it was also aimed to highlight the predictive factors of unfavourable evolution of these patients. The correlations between the characteristics of the isolated microorganisms and the location of the infections were analysed, with an emphasis on the antimicrobial resistance profile and the potential for biofilm formation, in order to highlight their impact on the treatment and clinical evolution of these patients.

The study analysed 478 clinical samples collected from patients included in the two groups, out of which 225 came from patients in group 2020 (G20) and 253 from patients in group 2023 (G23). The most numerous microbiological samples in both groups of patients were wound secretions (around 60% for both periods), followed by blood cultures, bronchial aspirates and urine cultures, with no statistically significant differences between the two groups in terms of sample distribution.

The results of the study revealed a statistically significant increase in MDR strains of *Pseudomonas* spp. in 2023 compared to 2020, a significant proportion of which were XDR and carbapenem-resistant. Also, all *A. baumannii* strains isolated in 2023 presented an MDR phenotype, the majority being XDR and carbapenem-resistant, an aspect consistent with

European data on the alarming level of antimicrobial resistance in Romania. Within Enterobacterales, *K. pneumoniae* demonstrated the highest microbiological impact, being the only species in which strains completely resistant to all classes of antibiotics tested were identified.

The data obtained highlights that infections caused by multidrug-resistant Gram-negative bacilli have been one of the main therapeutic challenges in burn patients during the COVID-19 pandemic and post-pandemic. The association between extensive antimicrobial resistance, high biofilm formation potential and persistence of infections suggests the involvement of complex mechanisms of bacterial adaptation, with a major impact on clinical evolution and available therapeutic options.

The results obtained demonstrated that wound secretions represented the main source of microbiological isolation in both analysed periods, confirming that post-burn wounds constitute a biological environment favourable to colonization and development of persistent infections. The prolonged duration of hospitalization in patients with extensive and deep burns suggests the involvement of complex mechanisms of bacterial persistence, among which biofilm formation would have a central role by maintaining chronic inflammation, protecting microorganisms and delaying tissue healing processes.

The microbiological profile identified in the study was dominated by microorganisms known for their high capacity to form biofilms, such as *S. aureus*, *Pseudomonas* spp., *Klebsiella* spp. and *Acinetobacter baumannii*. The persistence of these species in both time intervals investigated supports the possibility of the involvement of biofilms in the pathogenesis of burn wound infections and suggests the existence of stable microbial ecosystems, adapted to the tissue environment affected by burns. In particular, non-fermentative Gram-negative bacilli, especially *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp., had an important prevalence in wound secretions. These microorganisms are known for the formation of dense and well-organized biofilms, but also for their increased adaptability to stress conditions, hypoxia and exposure to antimicrobials, characteristics that favour their persistence in the wound and contribute to the chronicity of the lesions.

The study also highlighted an association between the severity of burns and the microbiological characteristics of the infections. The phenomena related to colonization with potentially biofilm-forming and multidrug-resistant pathogens have been predominantly encountered in patients with deep, grade III–IV burns, where tissue necrosis, local hypoxia,

and abundant exudate create favourable conditions for the organization of bacterial biofilm. These complex microbial structures contribute both to the maintenance of local infection and to the reduction of the effectiveness of antimicrobial treatment.

Another important aspect highlighted by the study is the high level of antimicrobial resistance, observed especially in the case of isolates of *Pseudomonas* spp., *Klebsiella* spp. and *Acinetobacter* spp. The frequent presence of MDR, DTR and XDR phenotypes supports the hypothesis of the involvement of the potential for biofilm formation associated with the facilitation of resistance gene transfer, respectively protecting bacteria from the action of antibiotics and host defence mechanisms. In this context, burn wound infections become difficult to control therapeutically, with an increased risk of persistent evolution and severe complications.

The results obtained emphasize the need for a complex and integrated therapeutic approach to burn wound infections, which combines microbiologically guided antibiotic therapy with appropriate local measures, such as repeated debridement and the use of specialized dressings. At the same time, the study data highlights the importance of continuous monitoring of antimicrobial resistance and the assessment of the biofilm-forming potential of the microorganisms involved, in order to optimize therapeutic management and reduce the risk of chronicity of infections.

The study highlighted the way in which the COVID-19 pandemic influenced the infectious pattern and antimicrobial resistance in a burn unit, providing useful data for optimizing infection management and developing future antimicrobial resistance control strategies.

The third research was included in chapter 10 (C10) entitled “Epidemiological study of the relationship between antimicrobial resistance genes and biofilm formation capacity in pathogens causing chronic wound infections”. The study aimed to provide molecular identification of antibiotic resistance genes, the description of resistance phenotypes based on the antibiogram and the phenotypic identification of biofilm-forming strains of bacterial isolates from chronic wounds of patients from the Vascular Surgery and Plastic Surgery departments of the SCJUPBT hospital. For analysis, a sample of strains from the species of interest was selected, according to the results of the first two stages and the identification of a group of resistance genes according to the previously identified resistance phenotypes. The aim was

also to identify the relationships between genetic portage and the ability to form biofilms, and then to study the resistance of biofilms to two antibiotics, meropenem and amikacin.

The selected strains were: *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Proteus mirabilis* among BGN and *Staphylococcus aureus* among CGP, pathogenic species with high frequencies in the departments presented above.

The selected samples were part of the working samples of patients admitted to the hospital departments, and the study of antibiotic sensitivity was performed as part of the routine microbiological diagnosis. The selection of strains that were included in the study was carried out in real time, throughout the procedures of diagnosing the samples, based on the inclusion criteria. Consequently, the present study constitutes a material to complete and deepen the knowledge of pathogenic germs in the hospital casuistry.

Gram-negative isolates were tested for the presence of beta-lactam, carbapenem, aminoglycoside resistance genes and Gram-positive isolates were tested for beta-lactam resistance, methicillin-resistant (MR), macrolide, fluoroquinolone and aminoglycoside resistance. The test targeted a selected panel of clinically relevant resistance genes and was designed exclusively for qualitative detection (presence/absence). The results were interpreted qualitatively only, based on amplification curves and cycle threshold (Ct) values.

Determination of biofilm formation capacity was performed using the microtiter plate technique. The absorbance (optical density, OD) of the stained adherent biofilm was measured with an automated micro-ELISA plate reader at a wavelength of 570 nm. Mean OD values were calculated for all tested strains and negative controls. Biofilm production was interpreted according to the criteria suggested by Stepanović et al. (2007).

Biofilm susceptibility testing to meropenem and amikacin was performed using the Calgary Biofilm Testing Device (MBEC Assay® Biofilm Inoculator with 96-well base), according to a revised protocol described by Pandelis et al. (2013). In this study, we determined the BCMI50 value, defined as the lowest antimicrobial concentration that inhibits 50% of biofilm growth, compared to the growth observed in positive control wells, also used in other studies [Pandelis, 2013]. This evaluation criterion was selected because biofilm responses to antimicrobial exposure were heterogeneous and often graded rather than binary, making complete inhibition thresholds less robust and more difficult to reproduce [Thieme, 2019].

Based on the sample and species selection criteria, the studied sample consisted of 88 bacterial strains, of which 69 (78.40%) were Gram-negative strains, represented by *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *P. mirabilis* and *A. baumannii*, and 19 (21.60%) were Gram-positive strains, represented by *S. aureus*. In the group of Gram-negative microorganisms, *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa* strains presented comparable frequencies significantly higher than *P. mirabilis* and *A. baumannii* strains. *S. aureus* isolates presented frequencies comparable to those of *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa*.

Many wound samples came from the Surgery department (78.66%), followed by the Burns Functional Unit, UFA (12%). The most common wounds were associated with peripheral arterial disease (36.36%), followed by diabetic wounds and burns (14.77%, 14.77%). Gram-negative pathogens, especially *P. aeruginosa* and *K. pneumoniae*, were predominantly isolated in chronic wounds from peripheral arterial disease, where they recorded the highest frequencies; *P. aeruginosa* was also frequently identified in chronic wounds caused by burns. *A. baumannii* was mainly associated with diabetic wounds and burns, while *S. aureus* was more frequently identified in postoperative wounds and wounds associated with peripheral arterial disease. In general, wounds related to peripheral arterial disease showed the highest diversity and microbial load.

K. pneumoniae, *A. baumannii* and *P. mirabilis* were the species with the highest rates of β -lactamase gene portage, with no statistically significant differences observed between them. The species with the lowest portage was *P. aeruginosa*. *K. pneumoniae* strains were significant carriers of *bl*genes (92.59%), encoding both ESBLs and carbapenemases; in addition, 66.66% of *K. pneumoniae* strains carried the entire group of ESBLs studied, namely TEM, SHV and CTX-M (beta-lactamases class A, Ambler classification). The most frequent genes encoding carbapenemases (*bla*-carba genes) were NDM (Ambler class B) and OXA48 (Ambler class D), with a statistically comparable incidence. The association of *bla*NDM with at least one *bla*OXA gene was recorded in 48.14% (n = 13) of the *K. pneumoniae* strains. These *bla*NDM-*bla*OXA-carrying strains also associated at least one of the three class A genes: TEM, SHV or CTX-M. The *K. pneumoniae* strains did not carry the AG resistance gene *aac*(6')-Ib nor the *bla*VIM gene.

Regarding the *P. aeruginosa* strains, 50% carried resistance genes. All types of β -lactamase-encoding genes were identified, with *bla*TEM being the most frequently detected. The identified carbapenemase-encoding *bl*genes belonged exclusively to the OXA group. All isolates carrying an OXA-type gene also showed at least one additional β -lactamase gene. *P.*

mirabilis strains frequently carried the *bla*TEM gene (72.72%), two of these isolates also carrying the CTX-M gene. *A. baumannii* strains all carried resistance genes, mainly *bla*TEM and *bla*OXA-23. Two strains carried multiple genes. The first associated SHV/CTX-M/NDM, while the second carried TEM/OXA23/OXA24/OXA48.

Regarding *S. aureus* strains, 57.89% (n = 11) showed at least one resistance gene. *MecA* strains were detected in many gene-carrying strains, while associations with other genes were observed only sporadically. It is important to note, however, that the rate of resistance gene portage among *S. aureus* isolates was significant, with 72.72% of them harbouring a single resistance gene.

Regarding resistance phenotypes, *K. pneumoniae* strains predominantly showed BLSE and carbapenem resistance phenotypes, associated with the *bla*SHV, *bla*NDM and *bla*OXA48 genes, confirming the circulation of complex resistance mechanisms. *P. aeruginosa* isolates demonstrated MDR and XDR phenotypes, some carrying carbapenemase genes, while most *A. baumannii* strains belonged to the XDR carbapenem-resistant type. Also, many of these isolates associated aminoglycoside resistance phenotypes. In the case of *S. aureus*, over half of the strains were MRSA, and the majority showed an MDR phenotype.

The study of the biofilm formation capacity showed that all the isolates examined were biofilm formers, with different intensity and proportions depending on the species. It was observed that many of the strains were strong/moderate biofilm formers (at least 80% of isolates from each species). Strains with high biofilm formation potential (B+++) were significantly more frequent in the case of *P. aeruginosa* isolates compared to *K. pneumoniae* and *P. mirabilis*, highlighting the high capacity of this species to develop mature and persistent biofilms. However, the frequency of strong biofilm-forming strains was comparable between *P. aeruginosa* and *A. baumannii*. In contrast, isolates of *K. pneumoniae*, *P. mirabilis* and *A. baumannii* predominantly showed a moderate biofilm formation phenotype (B++).

Analysis of the relationship between the carriage of resistance genes and the ability to form biofilm revealed a positive, strong and statistically significant association in the case of *K. pneumoniae* and *P. mirabilis* strains, suggesting the concurrent involvement of antimicrobial resistance and bacterial persistence mechanisms. In the case of *P. aeruginosa*, no statistically significant association was identified, as all isolates showed biofilm formation capacity, independent of the resistance genetic profile. For *A. baumannii*, the interpretation of this relationship was limited by the fact that all investigated strains carried resistance genes, while

the intensity of biofilm formation varied between isolates. Regarding *S. aureus*, the results show that these isolates were moderately biofilm forming in over 57% of cases. Analysis of the association between the carriage of resistance genes and the ability to form biofilm did not reveal a significant relationship between these variables.

Biofilm susceptibility to antibiotics was assessed using the Calgary Biofilm device. BCMI50 values were determined for all strains studied. The MIC was also evaluated for all planktonic forms of the strains. The antibiotics tested were meropenem and amikacin. Apart from *A. baumannii* testing to amikacin, the analysis showed that the antibiotic susceptibility of the biofilm forms of the bacteria, measured by BCMI50, was significantly lower than the susceptibility of planktonic bacteria measured by MIC and the differences were statistically significant, with a large effect size.

The study revealed a high prevalence of antimicrobial resistance genes among the strains isolated from chronic wounds, many of which were associated with a moderate or strong capacity to form biofilm. The association between antimicrobial resistance and biofilm significantly contributes to the persistence of infections and the delay in the healing of chronic wounds, highlighting the need for a personalized and integrated therapeutic approach. The presence of mature biofilms suggests the need for aggressive local debridement and biofilm control strategies, along with microbiologically guided antibiotic therapy.

Characterization of resistance genes provides additional information compared to conventional antimicrobial susceptibility testing, highlighting mechanisms involved in bacterial adaptation, horizontal gene transfer and antimicrobial tolerance associated with biofilm. In this context, the use of rapid molecular techniques such as multiplex PCR can facilitate the simultaneous identification of pathogens and resistance markers directly from the clinical sample, optimizing the therapeutic management of chronic wounds.

The results obtained support the integration of antibiofilm strategies into clinical practice and the development of targeted therapies, capable of reducing the persistence of infections and the subsequent selection of multi-resistant strains. At the same time, the study brings original data on the relationship between antimicrobial resistance and biofilm formation in chronic wounds, representing, as far as we know, the first study of this type conducted in western Romania.

Conclusions on biofilm tolerance to antibiotics

a. Significant increase in antibiotic tolerance in biofilm

Biofilms showed significantly higher tolerance to antibiotics compared to planktonic forms, for most species and antibiotics tested in the study.

b. High variability between strains

The response to antibiotics was heterogeneous, with the existence of some extremely resistant strains (outliers), which reflects the complexity of biofilms and the difficulty of treatment.

c. Limitations to clinical interpretation of the results

Although the differences in BCMI50 vs. CMI are statistically significant, they have no direct significance for clinical application due to the lack of standardization of the results (S/R) regarding the sensitivity and tolerance of biofilm to antibiotics. However, the results indicate a significantly increased tolerance of the biofilm phenotype of bacteria to antibiotics.

In conclusion, the results of the study demonstrate that bacteria involved in chronic non-healing wounds present a high potential for genetic multiresistance but also a high capacity for biofilm formation, which enhances antibiotic tolerance. The interaction between the two mechanisms contributes decisively to the persistence of chronic infections and the difficulty of treatment, demonstrating the need to apply therapeutic strategies adapted to the presence of biofilm in chronic non-healing wounds.

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
“VICTOR BABEȘ” DIN TIMISOARA
FACULTATEA DE MEDICINĂ
Departamentul XIV MICROBIOLOGIE**

MUȘUROI SILVIA-IOANA



TEZĂ DE DOCTORAT

**BACTERIILE BIOFILM – FORMATOARE ÎN INFECȚIILE PLĂGILOR
CRONICE NEVINDECABILE: STRATEGII DE OPTIMIZARE PRIVIND
DIAGNOSTICUL MICROBIOLOGIC ȘI MANAGEMENTUL
REZISTENȚEI ANTIMICROBIENE**

R E Z U M A T

Conducător de doctorat:

PROF. UNIV.DR.HABIL. MUNTEAN DELIA

**Timișoara
2026**

REZUMAT

Termenul de "plagă cronică" (chronic wound) este o noțiune generală utilizată pentru a denumi grupul heterogen al leziunilor cronice tegumentare, care diferă între ele prin etiologie, patogenie, dimensiune, localizare și evoluție, dar prezintă o caracteristică comună – incapacitatea de a se vindeca într-un interval fiziologic normal. În cercetarea doctorală de față termenii "plagă cronică", respectiv "secreție plagă" au fost utilizați în sensul larg al înțelesului lor, așa cum a fost prezentat anterior.

Există o recunoaștere tot mai mare a faptului că biofilmele sunt prezente în majoritatea rănilor cronice care nu se vindecă, unele studii indicând frecvențe mari, de pe peste 78% . Se subliniază tot mai adesea faptul că investigațiile microbiologice ale rănilor cronice sunt de o performanță diagnostică limitată deoarece oferă o identificare parțială a agenților infecțioși, într-un interval de timp de peste 24 ore. Există studii care au descris unele modele de diversitate a populației în plăgile cronice și au introdus conceptul de patogrupuri funcțional echivalente (functionally equivalent pathogroups - FEPs). În același timp, unele cercetări au demonstrat că metodele tradiționale de cultură utilizate ca instrument de diagnostic pot fi puternic influențate de diferiți factori care ar conduce la un diagnostic selecționat. Ca urmare, acești autori sugerează că ar fi utilă folosirea metodelor de diagnostic molecular de înaltă rezoluție, cum ar fi pirosecvențierea ampliconilor FLX codificați prin etichete bacteriene (bTEFAP) pentru diagnosticul infecțiilor din aceste plăgi nevindecabile

Cercetarea doctorală prezentă a avut ca scop investigarea genelor de rezistență antimicrobiană și a capacității de formare a biofilmului a izolatelor bacteriene din plăgile cronice ale pacienților din secțiile Spitalului Clinic Județean de Urgență "Pius Brinzeu" Timișoara (SCJUPBT). Speciile au fost selectate pe baza rezultatelor studiilor anterioare. De asemenea, a urmărit să evidențieze necesitatea unei abordări terapeutice personalizate a plăgilor cronice, luând în considerare mecanismele care stau la baza rezistenței la tratament. Acestea mecanisme se referă la factori bacterieni (cum sunt portajul de genele de rezistență și capacitatea de formare a biofilmului), la factorii legați de micromediul plăgii (colonizat de biofilm) respectiv la contribuția relativă a fiecăruia la profilul general de rezistență.

Partea generală a tezei de doctorat sintetizează informațiile actuale din literatura de specialitate privind problematica plăgilor cronice asociate biofilmului bacterian. Capitolele teoretice au abordat următoarele teme: *Fiziopatologia vindecării plăgilor* (C1), *Microbiologia plăgii* (C2), *Biofilmul bacterian în plăgile cronice* (C3), *Metode de diagnostic* (C4), *Tratamentul antibiotic al infecției cu biofilm* (C5) și *Metode de studiu al biofilmului* (C6).

În acest din urmă capitol și ulterior în capitolul 10 sunt prezentate metodele de studiu al biofilmului utilizate, parte din acestea cum sunt cultivarea pe plăcile Calgary biofilm și testarea sensibilității la antimicrobiene constituind o metodă nouă de diagnostic introdusă odată cu această cercetare în practica laboratorului nostru.

Partea specială a tezei este formată din patru capitole în care este descrisă activitatea de cercetare desfășurată. Aceasta a evidențiat importanța infecțiilor din plăgile cronice nevindecabile în practica medicală curentă privind incidența lor, impactul asupra bolnavilor (spitalizare, tratament, calitatea vieții) și incidența preponderentă a bacteriilor biofilm-formatoare în aceste plăgi. S-a demonstrat de asemenea importanța caracterului biofilm-formator al bacteriilor în evoluția nefavorabilă a procesului de vindecare a plăgii respectiv importanța unor abordări terapeutice inovatoare, aprofundate în acest sens, în vederea unui rezultat de succes a tratamentului. Primul capitol al acestei părți (C7) intitulat *Contextul clinic al infecțiilor cronice ale plăgii*, este o parte de introducere a activității de cercetare din cele trei studii prezentate ulterior.

Capitolul 8 (C8) intitulat *Patologia infecțioasă în medicina de urgență, incidența și importanța infecțiilor de plagă* prezintă prima cercetare, care s-a desfășurat în cadrul Departamentului de urgență (DU) al SCJUPBT, de-a lungul unei perioade de 6 luni. Participarea la studiu a pacienților din DU s-a realizat pe baza criteriilor de includere/excludere ce au definit infecțiile ca fiind dobândite în comunitate (ICA). Probele au fost prelevate pe cât posibil înainte de administrarea antibioticelor iar identificarea agenților patogeni, antibiograma și determinarea concentrației minime inhibitorii (CMI) au fost realizate conform protocoalelor Compartimentului Microbiologie al Laboratorului Clinic de Analize Medicale. Rezultatele studiului au pus în evidență fenomene importante privind activitatea în DU, legate de pacienți, probele recoltate și tulpinile izolate.

În perioada aflată în studiu, în serviciu DU s-au prezentat un număr de 25676 de pacienți, dintre care 7661 (29.83%) au fost internați prin serviciul de urgență. Numărul total al persoanelor internate în SCJUPB a fost de 12777, astfel încât pacienții internați prin DU au

reprezentat 59.96% din total internați. Evaluarea ponderii secțiilor de transfer a internărilor DU a arătat că specialitățile cele mai solicitate au fost Chirurgia, Neurologia și Gastroenterologia. Din grupul celor 7661 pacienți internați DU, 657 (8,57%) au fost diagnosticați cu infecții dobândite în comunitate (ICA), cauzatoare ale bolii de internare sau asociate acesteia, subliniind relevanța lor pentru impactul asupra patologiei infecțioase din cadrul spitalului. Pacienții DU cu diagnostic infecțios au reprezentat 37,69% din totalul pacienților cu infecții (1743) internați în această perioadă.

În ceea ce privește studiul infecțiilor DU-ICA, acesta s-a realizat pe un număr de 767 probe biologice ce au fost recoltate de la cei 657 pacienți DU-ICA, în vederea efectuării diagnosticului bacteriologic. Cele mai numeroase probe au fost uroculturile, secrețiile plagă și hemoculturile. Din cele 767 de probe analizate, au fost identificate 903 izolate microbiene, dintre care 48,95% au fost specii Enterobacterales, 10,08% bacili Gram-negativi (BGN) non-fermentativi, 34,22% coci Gram-pozitivi (GPC) și 4,98% fungi.

Bacteriile Gram-negative din familia Enterobacterales au fost predominante. *E. Coli* s-a afirmat ca specie dominantă (aprox. 25%), urmată de *Klebsiella* spp. și *S. aureus*. Distribuția acestor microorganisme în special în secrețiile plagă și probele de urocultură evidențiază importanța acestor patologii în ansamblul infecțiilor comunitare studiate.

În cazul probelor de secreție plagă au fost identificate predominant izolate Gram – negative aparținând speciilor *Pseudomonas* spp. și *Acinetobacter* spp., alături de *S. aureus* dintre speciile gram-pozitive. Importanța identificării acestor microorganisme rezidă din capacitatea lor crescută de a forma biofilme și nivelul ridicat de rezistență la antimicrobiene, caracteristici care favorizează persistența infecției, cronicizarea leziunilor și dificultăți terapeutice consecutive. Izolatele *E. coli* au fost identificate în principal în infecțiile urinare (aproximativ. 50% din uroculturi) iar tulpinile *Klebsiella* spp. au fost frecvent izolate în secrețiile de tract respirator și în urină.

În ceea ce privește rezistența la antimicrobiene, s-a observat un nivel ridicat de rezistență atât în cazul izolatelor predominante în plăgi cât și cazul tulpinilor identificate în alte tipuri de probe. Astfel *Pseudomonas* spp. a demonstrat rezistență la antimicrobiene semnificativă, cu proporții relevante de MDR și DTR. Tulpinile *Acinetobacter* spp. din studiu au exprimat cel mai ridicat nivel de rezistență, definind fenotipurile de tip MDR, DTR și XDR. *S. aureus* a fost caracterizat printr-o frecvență crescută a tulpinilor MRSA respectiv MDR. Tulpinile *E.coli* au prezentat o rezistență moderată, descrisă prin prezența fenotipurilor

microbiologice de tip BLSE SXT, FQ și a fenotipului epidemiologic MDR. Pentru Izolatele de *K. pneumoniae* rezistența la antimicrobiene a demonstrat prezența fenotipurilor BLSE, CRE respectiv MDR, DTR și XDR.

Rezultatele obținute sugerează existența unor mecanisme microbiologice complexe implicate în persistența infecțiilor și în posibilitatea de dezvoltare a biofilmului bacterian, demonstrând necesitatea unei abordări diagnostice și terapeutice integrate. În acest sens, studiul a subliniat importanța implementării metodelor rapide de diagnostic în Departamentul de Urgență, unde utilizarea frecventă a antibioterapiei favorizează selecția microorganismelor rezistente. Testele moleculare rapide (PCR) și biomarkerii facilitează inițierea precoce și adecvată a antibioterapiei și reduc utilizarea inutilă a antibioticelor. Ca urmare asocierea acestui tip de testare rapidă cu metodele convenționale de cultură, poate optimiza managementul antimicrobian al pacienților cu infecții de plagă și alte infecții comunitare

A doua cercetare a fost inclusă în capitolul 9 (C9) intitulat *Profilul infecțiilor bacteriene într-o unitate de arși în timpul și după perioada pandemiei Covid-19*. Studiul a urmărit investigarea diferențelor apărute în etiologia, tipul de probă infectată și profilul de rezistență antimicrobiană al tulpinilor bacteriene izolate în probele pacienților cu boală arsă spitalizați în Unitatea Funcțională Arși a SCJUPBT, în perioada pandemiei COVID-19 și post-pandemică; s-a urmărit de asemenea, evidențierea factorilor predictorii de evoluție nefavorabilă a acestor pacienți. Au fost analizate corelațiile dintre caracteristicile microorganismelor izolate și localizarea infecțiilor, cu accent pe profilul de rezistență antimicrobiană și potențialul de formare a biofilmului, în vederea evidențierii impactului acestora asupra tratamentului și evoluției clinice a acestor pacienți.

În cadrul studiului au fost analizate 478 probe clinice recoltate de la pacienții incluși în cele două loturi, dintre care 225 provenite de la pacienții din grupul 2020 (G20) și 253 de la pacienții din grupul 2023 (G23). Cele mai numeroase probe microbiologice în ambele grupuri de pacienți au fost secrețiile de plagă (în jur de 60% pentru ambele perioade), urmate de hemoculturi, aspirate bronșice și uroculturi, fără diferențe semnificative statistic între cele două loturi în ceea ce privește distribuția probelor.

Rezultatele studiului au evidențiat o creștere semnificativă statistic a tulpinilor MDR de *Pseudomonas* spp. în 2023 comparativ cu 2020, o proporție importantă dintre acestea fiind XDR și rezistente la carbapeneme. De asemenea, toate tulpinile de *A. baumannii* izolate în 2023 au prezentat fenotip MDR, majoritatea fiind XDR și rezistente la carbapeneme, aspect

concordant cu datele europene privind nivelul alarmant al rezistenței antimicrobiene în România. În cadrul Enterobacterales, *K. pneumoniae* a demonstrat cel mai ridicat impact microbiologic, fiind singura specie la care au fost identificate tulpini complet rezistente la toate clasele de antibiotice testate.

Datele obținute subliniază faptul că infecțiile produse de bacilii Gram-negativi multirezistenți au reprezentat una dintre principalele provocări terapeutice la pacienții cu arsuri în perioada pandemiei și post-pandemice COVID-19. Asocierea dintre rezistența extinsă la antimicrobiene, potențialul ridicat de formare a biofilmului și persistența infecțiilor sugerează implicarea unor mecanisme complexe de adaptare bacteriană, cu impact major asupra evoluției clinice și opțiunilor terapeutice disponibile.

Rezultatele obținute au demonstrat că secrețiile de plagă au reprezentat principala sursă de izolare microbiologică în ambele perioade analizate, confirmând faptul că plăgile post-arsură constituie un mediu biologic favorabil colonizării și dezvoltării infecțiilor persistente. Durata prelungită a spitalizării în cazul pacienților cu arsuri extinse și profunde sugerează implicarea unor mecanisme complexe de persistență bacteriană, dintre care formarea biofilmului ar avea un rol central prin menținerea inflamației cronice, protejarea microorganismelor și întârzierea proceselor de vindecare tisulară.

Profilul microbiologic identificat în studiu a fost dominat de microorganisme recunoscute pentru capacitatea lor crescută de formare a biofilmului, precum *S. aureus*, *Pseudomonas* spp., *Klebsiella* spp. și *Acinetobacter baumannii*. Persistența acestor specii în ambele intervale de timp investigate susține posibilitatea implicării biofilmelor în patogenезa infecțiilor asociate plăgilor arse și sugerează existența unor ecosisteme microbiene stabile, adaptate mediului tisular afectat prin arsură. În mod particular, bacilii Gram-negativi non-fermentativi, în special *Pseudomonas* spp. și *Acinetobacter* spp., au avut o prevalență importantă în secrețiile de plagă. Aceste microorganisme sunt cunoscute pentru formarea de biofilme dense și bine organizate, dar și pentru adaptabilitatea crescută la condiții de stres, hipoxie și expunere la antimicrobiene, caracteristici care favorizează persistența lor în plagă și contribuie la cronicizarea leziunilor.

Studiul a evidențiat, de asemenea, o asociere între severitatea arsurilor și particularitățile microbiologice ale infecțiilor. Fenomenele legate de colonizarea cu patogeni cu potențial biofilm-formator și multirezistenți au fost întâlnite predominant la pacienții cu arsuri profunde, de grad III–IV, unde necroza tisulară, hipoxia locală și exudatul abundent creează

condiții favorabile pentru organizarea biofilmului bacterian. Aceste structuri microbiene complexe contribuie atât la întreținerea infecției locale, cât și la reducerea eficienței tratamentului antimicrobian.

Un alt aspect important evidențiat de studiu îl reprezintă nivelul ridicat al rezistenței antimicrobiene, observat în special în cazul izolatelor de *Pseudomonas* spp., *Klebsiella* spp. și *Acinetobacter* spp. Prezența frecventă a fenotipurilor MDR, DTR și XDR susține ipoteza implicării potențialului de formare a biofilmelor asociat cu facilitarea transferului de gene de rezistență, respectiv protejarea bacteriilor față de acțiunea antibioticelor și mecanismele de apărare ale gazdei. În acest context, infecțiile plăgilor arse devin dificil de controlat terapeutic, cu risc crescut de evoluție persistentă și complicații severe.

Rezultatele obținute subliniază necesitatea unei abordări terapeutice complexe și integrate a infecțiilor asociate plăgilor arse, care să combine antibioterapia ghidată microbiologic cu măsuri locale adecvate, precum debridarea repetată și utilizarea pansamentelor specializate. Totodată, datele studiului evidențiază importanța monitorizării continue a rezistenței antimicrobiene și a evaluării potențialului biofilm-formator al microorganismelor implicate, pentru optimizarea managementului terapeutic și reducerea riscului de cronicizare a infecțiilor.

Studiul a evidențiat modul în care pandemia COVID-19 a influențat patternul infecțios și rezistența antimicrobiană într-o unitate de arsuri, furnizând date utile pentru optimizarea managementului infecțiilor și dezvoltarea strategiilor viitoare de control al rezistenței antimicrobiene.

A treia cercetare a fost inclusă în capitolul 10 (C10) intitulat *Studiu epidemiologic al relației dintre genele de rezistență antimicrobiană și capacitatea de formare a biofilmului la agenții patogeni care cauzează infecții cronice ale rănilor*. Studiul a urmărit identificarea moleculară a unor gene de rezistență la antibiotice, descrierea fenotipurilor de rezistență pe baza antibiogramei și identificarea fenotipică a tulpinilor biofilm formatoare a izolatelor bacteriene din plăgile cronice ale pacienților din secțiile Chirurgie vasculară și Chirurgie plastică spitalului SCJUPBT. Pentru analiză s-a realizat selectarea unui eșantion de tulpini din speciile de interes, conform rezultatelor din primele două etape și identificarea unui grup de gene de rezistență conform fenotipurilor de rezistență identificate anterior. S-a urmărit de asemenea identificarea relațiilor dintre portajul genetic și capacitatea de formare a biofilmelor, iar mai apoi studiul rezistenței biofilmelor la două antibiotice, meropenem și amikacină.

Tulpinile selectate au fost: *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* și *Proteus mirabilis* dintre BGN, respectiv *Staphylococcus aureus* dintre CGP, specii patogene cu frecvențe mari în secțiunile prezentate mai sus.

Probele selectate au făcut parte din probele de lucru ale pacienților internați în secțiunile spitalului, iar studiul sensibilității la antibiotice s-a realizat ca parte a diagnosticului microbiologic de rutină. Selecția tulpinilor pentru introducerea în studiu s-a efectuat în timp real, de-a lungul procedurilor de diagnostic al probelor, pe baza criteriilor de includere. În consecință studiul prezent se constituie a fi un material de completare și aprofundare a cunoașterii germenilor patogeni din cazuistica spitalului.

Izolatele Gram-negative au fost testate pentru prezența genelor de rezistență la beta-lactamine, carbapeneme, aminoglicozide, iar cele Gram-pozitive au fost testate pentru rezistența la beta-lactamine, caracterul meticilino-rezistent (MR), rezistența la macrolide, fluorochinolone și amino-glicozide. Testul a vizat un panel selectat de gene de rezistență relevante clinic și a fost conceput exclusiv pentru detectarea calitativă (prezență/absență). Rezultatele au fost interpretate doar calitativ, pe baza curbelor de amplificare și a valorilor pragului ciclului (Ct).

Determinarea capacității de formare a biofilmului a fost efectuată utilizând tehnica plăcii de microtitrare. Absorbanța (densitatea optică, DO) a biofilmului aderent colorat a fost măsurată cu un cititor automat de plăci micro-ELISA, la o lungime de undă de 570 nm. Valorile medii DO au fost calculate pentru toate tulpinile testate și controalele negative. Producția de biofilm a fost interpretată în conformitate cu criteriile sugerate de Stepanović și colab. (2007).

Testarea susceptibilității biofilmului la meropenem și amikacină a fost efectuată utilizând dispozitivul Calgary pentru testarea biofilmului (MBEC Assay® Biofilm Inoculator cu bază cu 96 de godeuri), în conformitate cu un protocol revizuit descris de Pandelis și colab.(2013). În acest studiu, am determinat valoarea BCMI₅₀, definită ca fiind cea mai mică concentrație antimicrobiană care inhibă 50% din creșterea biofilmului, comparativ cu creșterea observată în godeurile de control pozitiv, utilizată și în alte studii [Pandelis, 2013]. Acest criteriu de evaluare a fost selectat deoarece reacțiile biofilmului la expunerea antimicrobiană au fost heterogene și adesea graduale mai degrabă decât binare, ceea ce face ca pragurile de inhibare completă să fie mai puțin robuste și mai dificil de reprodus [Thieme, 2019].

Pe baza criteriilor de selecție a probelor și a speciilor, eșantionul studiat a fost format din 88 de tulpini bacteriene, dintre care 69 (78,40%) au fost tulpini Gram-negative,

reprezentate de *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *P. mirabilis* și *A. baumannii*, iar 19 (21,60%) au fost tulpini Gram-pozitive, reprezentate de *S. aureus*. În grupul microorganismelor Gram-negative, tulpinile *K. pneumoniae* și *P. aeruginosa* au prezentat frecvențe comparabile semnificativ mai mari decât tulpinile *P. mirabilis* și *A. baumannii*. Izolatele de *S. aureus* au prezentat frecvențe comparabile cu cele ale *K. pneumoniae* și *P. aeruginosa*.

Majoritatea probelor de plăgi au provenit din secția Chirurgie (78,66%), urmată de Unitatea Funcțională de Arsuri, UFA (12%). Cel mai frecvent plăgile au fost asociate cu boala arterială periferică (36,36%), urmate de plăgile diabetice și arsuri (14,77%, 14,77%). Agenții patogeni Gram-negativi, în special *P. aeruginosa* și *K. pneumoniae*, au fost izolați predominant în plăgile cronice din boala arterială periferică, în care au înregistrat frecvențele cele mai înalte; *P. aeruginosa* a fost, de asemenea, identificată frecvent în plăgile cronice cauzate de arsuri. *A. baumannii* a fost asociat în principal cu plăgile diabetice și plăgile din arsuri, în timp ce *S. aureus* a fost identificat mai frecvent în plăgile postoperatorii și plăgile asociate cu boala arterială periferică. În general, plăgile legate de boala arterială periferică au prezentat cea mai mare diversitate și încărcătură microbiană.

K. pneumoniae, *A. baumannii* și *P. mirabilis* au fost speciile cu cele mai mari rate de portaj de gene pentru β -lactamaze, fără a se observa diferențe semnificative statistic între ele. Specia cu portajul cel mai scăzut a fost *P. aeruginosa*. Tulpinile de *K. pneumoniae* au fost purtătoare semnificative de *bla*gene (92,59%), codificând atât BLSE-uri, cât și carbapenemaze; în plus, 66,66% dintre tulpinile de *K. pneumoniae* au purtat întregul grup de BLSE studiat, respectiv TEM, SHV și CTX-M (beta-lactamaze clasa A, clasificarea Ambler). Cele mai frecvente gene codificatoare de carbapenemaze (gene *bla*-carba) au fost NDM (clasa Ambler B) și OXA48 (clasa Ambler D), cu o incidență statistic comparabilă. Asocierea *bla*NDM cu cel puțin o genă *bla*OXA a fost înregistrată la 48,14% (n = 13) dintre tulpinile de *K. pneumoniae*. Aceste tulpini purtătoare de *bla*NDM-*bla*OXA au asociat, de asemenea, cel puțin una dintre cele trei gene de clasa A: TEM, SHV sau CTX-M. Tulpinile de *K. pneumoniae* nu au purtat gena de rezistență la AG *aac(6')-Ib* și nici gena *bla*VIM.

În ceea ce privește tulpinile de *P. aeruginosa*, 50% au fost purtătoare de gene de rezistență. Au fost identificate toate tipurile de gene care codifică β -lactamază, *bla*TEM fiind cea mai frecvent detectată. *Bl*agenele de codificare a carbapenemazelor identificate au aparținut exclusiv grupului OXA. Toate izolatele purtătoare ale unei gene de tip OXA au prezentat, de asemenea, cel puțin o genă suplimentară de β -lactamază. Tulpinile *P. mirabilis* au fost frecvent purtătoare ale genei *bla*TEM (72,72%), două dintre aceste izolate purtând și

gena CTX-M. Tulpinile de *A. baumannii* au fost toate purtătoare de gene de rezistență, în principal *bla*TEM și *bla*OXA-23. Două tulpini au fost purtătoare de gene multiple. Prima a asociat SHV/CTX-M/NDM, în timp ce a doua a purtat TEM/OXA23/OXA24/OXA48.

În ceea ce privește tulpinile de *S. aureus*, 57,89% (n = 11) au indicat cel puțin o genă de rezistență. Tulpinile *MecA* au fost detectate în majoritatea tulpinilor purtătoare de gene, în timp ce asocierile cu alte gene au fost observate doar sporadic. Este important de semnalat însă că rata portajului de gene de rezistență în rândul izolatelor de *S. aureus* a fost semnificativă, cu 72,72% dintre acestea putând o singură genă de rezistență.

În ceea ce privește fenotipurile de rezistență, tulpinile de *K. pneumoniae* au prezentat predominant fenotipuri BLSE și rezistență la carbapeneme, asociate în special cu genele *bla*SHV, *bla*NDM și *bla*OXA48, confirmând circulația unor mecanisme complexe de rezistență. Izolatele de *P. aeruginosa* au demonstrat fenotipuri MDR și XDR, unele fiind purtătoare de gene carbapenemazice, în timp ce majoritatea tulpinilor de *A. baumannii* au aparținut tipului XDR rezistent la carbapeneme. De asemenea, multe dintre aceste izolate au asociat fenotipuri de rezistență la aminoglicozide. În cazul *S. aureus*, peste jumătate dintre tulpini au fost MRSA, iar majoritatea au prezentat fenotip MDR.

Studiul capacității de formare a biofilmului a arătat că toate izolatele examinate au fost formatoare de biofilm, cu intensitate și proporții diferite în funcție de specie. S-a observat că majoritatea tulpinilor au fost formatoare de biofilm puternic/mediu (cel puțin 80% izolate din fiecare specie). Tulpinile cu potențial crescut de formare a biofilmului (B+++) au fost semnificativ mai frecvente în cazul izolatelor de *P. aeruginosa* comparativ cu *K. pneumoniae* și *P. mirabilis*, evidențiind capacitatea ridicată a acestei specii de a dezvolta biofilme mature și persistente. Frecvența tulpinilor puternic biofilm-formatoare a fost însă comparabilă între *P. aeruginosa* și *A. baumannii*. În schimb, izolatele de *K. pneumoniae*, *P. mirabilis* și *A. baumannii* au prezentat predominant un fenotip moderat de formare a biofilmului (B++).

Analiza relației dintre portajul genelor de rezistență și capacitatea de formare a biofilmului a evidențiat o asociere pozitivă, puternică și semnificativă statistic în cazul tulpinilor de *K. pneumoniae* și *P. mirabilis*, sugerând implicarea concomitentă a mecanismelor de rezistență antimicrobiană și persistență bacteriană. În cazul *P. aeruginosa*, nu a fost identificată o asociere statistic semnificativă, deoarece toate izolatele au prezentat capacitate de formare a biofilmului, independent de profilul genetic de rezistență. Pentru *A. baumannii*, interpretarea acestei relații a fost limitată de faptul că toate tulpinile investigate au fost

purtătoare de gene de rezistență, în timp ce intensitatea formării biofilmului a variat între izolate. În ceea ce privește *S. aureus*, rezultatele arată că aceste izolate au fost moderat formatoare de biofilm în peste 57% din cazuri. Analiza asocierii dintre purtarea genelor de rezistență și capacitatea de formare a biofilmului nu a relevat o relație semnificativă între aceste variabile.

Sensibilitatea biofilmului la antibiotice a fost evaluată utilizând dispozitivul Calgary Biofilm. Valorile BCMI₅₀ au fost determinate pentru toate tulpinile studiate. De asemenea, a fost evaluată CMI pentru toate formele planctonice ale tulpinilor. Antibioticele testate au fost meropenem și amikacină. Cu excepția testării *A. baumannii* la amikacină, analizele au arătat că sensibilitatea la antibiotice a formelor de biofilm ale bacteriilor, măsurată prin BCMI₅₀, a fost semnificativ mai mică decât sensibilitatea bacteriilor planctonice măsurată prin CMI, iar diferențele au fost semnificative statistic, cu o dimensiune mare a efectului.

Studiul a evidențiat o prevalență ridicată a genelor de rezistență antimicrobiană în rândul tulpinilor izolate din plăgile cronice, multe dintre acestea asociind o capacitate moderată sau puternică de formare a biofilmului. Asocierea dintre rezistența antimicrobiană și biofilm contribuie semnificativ la persistența infecțiilor și la întârzierea vindecării plăgilor cronice, subliniind necesitatea unei abordări terapeutice personalizate și integrate. Prezența biofilmelor mature sugerează necesitatea unor strategii locale agresive de debridare și control al biofilmului, alături de antibioterapie ghidată microbiologic.

Caracterizarea genelor de rezistență oferă informații suplimentare față de testarea convențională a sensibilității antimicrobiene, evidențiind mecanisme implicate în adaptarea bacteriană, transferul orizontal de gene și toleranța antimicrobiană asociată biofilmului. În acest context, utilizarea tehnicilor moleculare rapide de tip multiplex PCR poate facilita identificarea simultană a agenților patogeni și a markerilor de rezistență direct din proba clinică, contribuind la optimizarea managementului terapeutic al plăgilor cronice.

Rezultatele obținute susțin integrarea strategiilor antibiofilm în practica clinică și dezvoltarea unor terapii țintite, capabile să reducă persistența infecțiilor și selecția ulterioară a tulpinilor multirezistente. Totodată, studiul aduce date originale privind relația dintre rezistența antimicrobiană și formarea biofilmului în plăgile cronice, reprezentând, din cunoștințele noastre, primul studiu de acest tip realizat în vestul României.

Concluzii privind toleranța biofilmului la antibiotice

a. Creșterea semnificativă a toleranței la antibiotice în biofilm

Biofilmele au prezentat o toleranță semnificativ mai mare la antibiotice comparativ cu formele planctonice, pentru majoritatea speciilor și a antibioticelor testate în studiu.

b. Comportament cu variabilitate mare între tulpini

Răspunsul la antibiotice a fost heterogen, cu existența unor tulpini extrem de rezistente (outliers), ceea ce reflectă complexitatea biofilmelor și dificultatea tratamentului.

c. Limitări ale interpretării clinice a rezultatelor

Deși diferențele BCMI50 vs. CMI sunt semnificative statistic, acestea nu au semnificație directă pentru aplicare în clinică datorită lipsei standardizării rezultatelor (S/R) privind sensibilitatea, respectiv toleranța biofilmului la antibiotice. Rezultatele indică însă, o toleranță semnificativ crescută a fenotipului biofilm a bacteriilor la antibiotice.

În concluzie, rezultatele studiului demonstrează că bacteriile implicate în plăgile cronice nevindecabile, prezintă un potențial ridicat de multirezistență genetică dar și o capacitate ridicată de formare a biofilmelor, ce amplifică toleranța la antibiotice. Interacțiunea dintre cele două mecanisme contribuie în mod decisiv la persistența infecțiilor cronice și la dificultatea tratamentului, demonstrând necesitatea aplicării unor strategii terapeutice adaptate prezenței biofilmului în plăgile cronice nevindecabile.