



УНИВЕРЗИТЕТ „СВ. КИРИЛ И МЕТОДИЈ“ - СКОПЈЕ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

Јулија Митрова Телента

МИКРОБИОЛОГИЈА НА ХРОНИЧНИТЕ
РАНИ, ЕВАЛУАЦИЈА НА
ПОТЕНЦИЈАЛОТ ЗА СОЗДАВАЊЕ
БИОФИЛМ И ОСЕТЛИВОСТ КОН
АНТИМИКРОБНИ СРЕДСТВА КАЈ
ИЗОЛАТИТЕ

Докторски труд

Скопје, 2025

Докторанд:

Јулија Митрова Телента

Тема:

Микробиологија на хроничните рани, евалуација на потенцијалот за создавање биофилм и осетливост кон антимикробни средства кај изолатите

Ментор:

Проф. д-р Никола Пановски

Рецензентска комисија:

Проф. д-р Сузана Николовска –претседател

Проф. д-р Никола Пановски- ментор

Проф. д-р Катерина Дамевска-член

Проф. д-р Жаклина Цековска-член

Проф.д-р Весна Гривчева Пановска-член

Научна област на докторскиот труд:

Клиничка медицина

Датум на одбрана:

29.09.2025

На мојот покоен татко, Благој, чија љубов, поддршка и пример ми го осветлуваа патот дури и кога тој веќе не беше со нас.

Твојата верба во мене живее во секоја страница од ова дело!

На моето семејство- ви благодарам за трпението, охрабрувањето и безусловната љубов.

Без вас, ова патување немаше да биде возможно!

Содржина:

АПСТРАКТ

ЛИСТА НА КРАТЕНКИ

1.0 ВОВЕД.....	1
1.1 Дефиниција и класификација на рани.....	1
1.2 Процес на здравување на рана.....	2
1.3 Микробиомот на кожата и улогата во настанувањето на хроничните рани.....	6
1.4 Биофилм кај хронични рани.....	7
1.5 Дијагностички процедури за биофилм кај хронични рани.....	14
1.6 Терапија на биофилм кај хроничните рани.....	18
1.7 Антимикробна резистенција кај биофилм.....	28
2.0 МОТИВ.....	31
3.0 ЦЕЛИ.....	32
3.1 Генерална цел.....	32
3.2 Специфични цели.....	32
4.0 МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ.....	33
4.1 Место на изведување и дизајн на студијата	33
4.2 Примерок на испитаници.....	33
4.3 Критериуми за вклучување во студијата.....	33
4.4 Критериуми за исклучување од студијата.....	33
4.5 Поделба во групи.....	34
4.6 Методологија.....	34

4.7 Микробиолошки методи.....	35
4.8 Утврдување на способност за создавање биофилм.....	37
4.9 Статистичка анализа.....	39
5.0 РЕЗУЛТАТИ.....	40
5.1 Основни карактеристики на пациентите и на хроничните рани.....	40
5.2 Микробиологија на рани.....	42
5.3 Брзина и степен на заздравување на раните.....	58
5.4 Антимикробна осетливост/резистентност на изолатите.....	75
6.0 ДИСКУСИЈА.....	94
6.1 Хроничните рани - социјален и економски товар на општеството.....	94
6.2 Анализа на основните карактеристики на пациентите.....	95
6.3 Микробиологија на хроничните рани.....	97
6.4 Присуство на биофилм во хроничните рани и потенцијал за создавање кај поедините изолати.....	102
6.5 Антимикробна осетливост/резистентност кај изолатите од хроничните рани.....	107
6.6 Клинички импликации–биофилм и успех во третманот на хроничните рани.....	114
7.0 ЗАКЛУЧОК.....	117
8.0 КОРИСТЕНА ЛИТЕРАТУРА.....	122

ИЗВАДОК

Целта на оваа дисертација е да се испитаат микробиолошките агенси кај хроничните рани, нивниот потенцијал за создавање биофилм и нивната осетливост кон антимикробните средства.

Истражувањето вклучи 100 пациенти со хронични рани прегледани и лекувани на Универзитетската Клиника за дерматологија и Институтот за микробиологија на Медицинскиот факултет во Скопје. Клиничките податоци беа собрани преку детални дерматолошки прегледи, микробиолошки брисеви од рана и микробиолошки анализи со методот за детекција на биофилм кај изолатите TCP(tissue culture plate). Осетливоста на изолатите кон антибиотици се одредуваше со агар дифузиони методи и автоматизирана техника.

Резултатите покажаа присуство на микроорганизми во раните кај 67% од пациенти, со најчеста застапеност на *Staphylococcus aureus* (35.82%), *Pseudomonas aeruginosa* (19.4%), *Enterobacter* (19.4%), и *Escherichia coli* (17.91%). Кај 71,9% од изолатите од хронични рани се докажа потенцијал за биофилм. Значајно почесто заздравување на раната имаа пациентите без изолирани микроорганизми ($p<0.0001$). Заздравувањето на раната сигнификантно беше асоцирано со инфилтрација на раната со *Staphylococcus aureus* ($p=0.0004$), а исто така значително зависеше од степенот на продукција на биофилм на изолатите($p=0.0006$).

Резистентноста кон пеницилини, цефалоспорини и карбапенеми беше со висок степен 80%-100%. Немаше разлика во осетливоста кон антимикробните средства помеѓу изолатите со и без потенцијал за биофилм.

Овие наоди укажуваат на потребата за специфични антимикробни стратегии насочени кон биофилмот, за да се подобрат терапевтските резултати.

Клучни зборови: хронични рани, микробиологија, биофилм, антимикробна осетливост

ABSTRACT:

The aim of this dissertation is to investigate the microbiological agents present in chronic wounds, their potential for biofilm formation, and their susceptibility to antimicrobial agents.

The study included 100 patients with chronic wounds, examined and treated at the University Clinic of Dermatology and the Institute of Microbiology, Faculty of Medicine in Skopje. Clinical data were collected through comprehensive dermatological examinations, microbiological wound swabs, and microbiological analyses using the tissue culture plate (TCP) method for biofilm detection. Antibiotic susceptibility of the isolates was determined using agar diffusion techniques and automated methods.

The results revealed the presence of microorganisms in 67% of the patients' wounds, with the most frequently isolated species being *Staphylococcus aureus* (35.82%), *Pseudomonas aeruginosa* (19.4%), *Enterobacter* spp. (19.4%), and *Escherichia coli* (17.91%). Biofilm formation potential was demonstrated in 71.9% of the isolates from chronic wounds. Wound healing was significantly more frequent in patients without microbial isolates ($p < 0.0001$). Wound healing was also significantly associated with infection by *Staphylococcus aureus* ($p = 0.0004$) and was notably influenced by the degree of biofilm production in the isolates ($p = 0.0006$).

Resistance to penicillins, cephalosporins, and carbapenems was high, ranging from 80% to 100%. No significant difference in antimicrobial susceptibility was observed between isolates with and without biofilm-forming potential.

These findings highlight the need for specific antimicrobial strategies targeting biofilm to improve therapeutic outcomes.

Keywords: chronic wounds, microbiology, biofilm, antimicrobial susceptibility

ЛИСТА СО КРАТЕЖИ

Agr- Accessory gene regulator

AHLs- Acyl Homoserine Lactones

AI-AutoInducer

Ami-Amikacin

Amo cla- Amoxicillin Clavulonate

Amo- Amoxicillin

AMR-Anti Microbial Resistance

AT-MSC- Adipose Tissue Mesenchymal Stem Cell

Az-Azitromicin

BBWC- Biofilm-Based Wound Care

CAESAR-Central Asian and Eastern European Surveillance of Antimicrobial Resistance

Cef-Cefoxitin

Cf-Ceftaroline(zinforo)

Cfp-Cefepime

Cfr-Cefuroxime

Cft-Ceftazidime

Cfx-Ceftriaxone

CLSM-Confocal Laser Scanning Microscopy

Col-Colistin

Cpr-Ciprofloxacin

CRPA- Carbapenem Resistant Pseudomonas aeruginosa

DFU-Diabetic Foot Ulcer

DGGE-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis

DspB- Dispersin B

EARS-Net- The European Antimicrobial Resistance Surveillance Network

ECDC-European Center for Disease Control

ECM-ExtraCellular Matrix

eDNA-extracellular DeoxyriboNucleic Acid

EDTA-Ethylenediaminetetraacetic acid

EFG- Elongation Factor G

ELISA- Enzyme-Linked Immunoassay

EPS-Extracellular Polymeric Substances

Er-Eritromicin

Ert-Ertapenem

ESBL Enterobacter- Extended Spectrum Beta Lactamase Enterobacter

ESBL Escherichia coli- Extended Spectrum Beta Lactamase Escherichia coli

ESCMID- The European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases

EUCAST- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

Flu-Flucloxacillin

FRACS- Full Ribosomal Amplification, Cloning and Sanger sequencing

Gen-Gentamicin

GLASS- Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System

HBOT-HyperBaric Oxygen Therapy

HLGR Enterococcus faecalis- High Level Gentamicin Resistant Enterococcus faecalis

HPA- Hypothalamic-Pituitary-Adrenal axis

HWP-Hyphal Wall Protein gene

IGF- Insulin Growth Factor

IL-1 β -Interleukin 1 β

IL-6-Interleukin 6

Imi-Imipenem

Kl-Klaritromicin

Kli-Klindamicin

Kot-Kotrimoxasole

Lin-Linezolid

LPS-LipoPolySaccharide

MBEC- Minimum Biofilm Eradication Concentration

MDR- Multi Drug Resistance

Mer-Meropenem

MMPs-matrix metalloproteinases

MRSA-Methicillin Resistant Staphylococcus Aureus

MSSA- Methicillin Sensitive Staphylococcus Aureus

MSC-Mesenchymal Stem Cell

NCLSI- National Clinical Laboratory Standard Institute

NPWT-Negative Pressure Wound Therapy

OD- Optical Density

PDGF- Platelet Derived Growth Factor

Pen-Penicillin

PHMB- PolyHexaMethylene Biguanide

Pip taz-Piperacilin tazobactam

PMN- PolyMorphoNuclear leukocyte

PNA-FISH-Peptide Nucleic Acid Fluorescence In Situ Hybridization

PRADS- Partial Ribosomal Amplification, Density gradient gel electrophoresis (DGGE) and Sanger sequencing

PRAPS- Partial Ribosomal Amplification and Pyrosequencing

QS- Quorum Sensing

QSI – Quorum Sensing Inhibitors

Rif-Rifampicin

RIP- RNAIII Inhibiting Peptide

RIVM- Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu(National Institute for Public Health and the Environment)

RNAIII-RiboNucleic Acid III

ROS-Reactive Oxidative Stress

RpoS -RNA polymerase, sigma S

SCVs- Small Colony Variants

SD- Standard Deviation

SEM-Scanning Electron Microscopy

TCP - Tissue Culture Plate method

TGF- β - Transforming Growth Factor β

TLR-2-Tool Like Receptor 2

TLR-4- Tool Like Receptor 4

TNF- α - Tumor Necrosis Factor α

Van-Vankomicin

VBNC- Viable But Non-Culturable

VEGF- Vascular Endothelial Growth Factor

VRE- Vancomycin Resistant Enterococcus

VRSA- Vancomycin Resistant Staphylococcus Aureus

WUWHS- World Union of Wound Healing Societies

ДНК-ДезоксирибоНуклеинска Киселина

ТСБ- Триптиказа Соја Бујон

ИЗЈАВИ

Изјавувам дека докторскиот труд го изработив самостојно, дека уредно ги цитирам сите користени извори и литература и дека трудот не е користен во рамките на други користени универзитетски студии или за стекнување на друго звање.

с.р

Изјавувам дека електронската верзија на овој труд е идентична со печатената верзија

с.р

1.0 ВОВЕД

Хроничните рани претставуваат сериозен клинички и јавно-здравствен предизвик поради нивната долготрајна природа, склоност кон инфекции и намалена способност за заздравување. Тие не се само локализирани повреди, туку сложени биолошки микросветови каде што интеракцијата меѓу домаќинот, микробиомот и имунолошкиот одговор ги обликува условите за хроничитет и инфекција.

1.1 Дефиниција и класификација на рани

Кожата, како најголем и најсложен орган, претставува невидлива, но истовремено и нераздвојна граница помеѓу внатрешниот свет на организмот и надворешните штетни влијанија. Нејзините три основни слоја епидермис, дермис и хиподермис не само што ја дефинираат нејзината структура, туку и неуморно ја исполнуваат функцијата на заштита, изолација и поврзување на организмот со неговата околина[1-3].

Раните се дефинираат како нарушувања на интегритетот на кожата предизвикано од различни нокси. Заздравувањето претставува комплексен, оркестриран процес со цел обновување на нормалната структура и функција на кожата [4]. Класификацијата на раните се заснова на етиологијата, според Rank – Wakefield системот, времетраењето на заздравувањето на раните, интегритетот на кожата, степенот на контаминација и морфолошките карактеристики[5]. Според етиологијата раните може да бидат трауматски, изгореници, пенетрирачки рани и инцизиони. Според Rank –Wakefield системот се класифицирани како чисти и нечисти без разлика дали се хируршки сугурирани или не. Според времетраењето на заздравувањето на раните се разликуваат акутни и хронични рани. Акутните рани зараснуваат веднаш, за неколку недели, а хроничните рани не зараснуваат на време, обично зараснуваат во период од неколку недели. Раните можат да бидат отворени и затворени според интегритетот на кожата. Според степенот на контаминација, тие се класифицирани како чисти, чисти-контаминирани, контаминирани и нечисти рани. Морфолошки раните се поделени на модринки, абразивни, лацерирачки, инцизиони, пенетрирачки рани.

Хроничните рани може да се класифицираат како рани од притисок (декубитус и невропатски улкуси), воспалителни рани (автоимуни и примарни кожни нарушувања), рани од васкуларна природа (венски, артериски и мешани улкуси), рани од малигни заболувања (примарни и секундарни кожни малигни заболувања), рани од друга етиологија (изгореници, повреди од зрачење, смрзнатини, васкулитични улкуси, каснувања од инсекти)[5].

Хроничните рани се оние кои не заздравуваат во стандардниот временски период (≥ 4 недели) и обично се асоцирани со инфекција, васкуларни нарушувања или системски болести [6–8]. Нивното лекување претставува значителен клинички и економски предизвик [9].

1.2 Процес на заздравување на рана

Заздравувањето на раните се одвива во четири фази: хемостаза, инфламација, пролиферација и ремоделирање [4,6].

1.2.1 Фази на заздравување

А) Хемостаза

Веднаш по повредата се активираат тромбоцитите, кои преку ослободување на фактори на раст (TGF- β , PDGF, VEGF, IGF) иницираат коагулација и привлекуваат имунолошки клетки [10–12].

Б) Инфламација

Во оваа фаза доминираат неутрофилите, макрофагите и кератиноцитите, кои преку продукција на цитокини и реактивни кислородни видови (ROS) придонесуваат за елиминација на патогените и регулација на воспалението [13–17]. M1 макрофагите продуцираат IL-1 β , TNF- α и други медијатори, додека преминувањето кон M2 фенотипот означува транзиција кон фаза на регенерација [18–19].

В) Пролиферација

Карактеристична е за пролиферација и миграција на кератиноцити, ангиогенеза стимулирана од VEGF, и синтеза на нов ЕСМ од страна на фибробластите. Во

процесот учествуваат и матични клетки од кожни фоликули и адипозно ткиво [20–24]. Гранулационото ткиво што се формира во оваа фаза е богато со колаген, фибронектин и хијалуронска киселина [25].

Г) Ремоделирање

Во финалната фаза се случува реорганизација на ECM со учество на миофибробласти кои придонесуваат за контракција на ткивото [26–28]. Дисбалансот во овој процес може да резултира со хипертрофични лузни и келоиди, состојби чии механизми сè уште не се целосно разјаснети [29–30].

Пореметување на било која фаза од процесот доведува до хроничитет на раната [31].

1.2.2 Фактори што влијаат врз процесот на заздравување на раните

Заздравувањето на раните е комплексен и динамичен процес кој вклучува координација на повеќе системи и механизми. Различни ендогени и екзогени фактори можат значајно да влијаат на брзината и квалитетот на ткивната регенерација. Во ова потпоглавје се разгледуваат клучните фактори кои го модулираат процесот на заздравување.

А) Оксигенација

Кислородот игра централна улога во сите фази на заздравување преку стимулирање на ангиогенеза, миграција и диференцијација на кератиноцити, синтеза на колаген, како и продукција на ROS (реактивни кислородни видови) кои делуваат како сигнални молекули и антимикробни агенси [32,33]. Привремена хипоксија веднаш по повреда има стимулирачки ефект, но продолжената хипоксија го нарушува процесот на заздравување преку намалување на клеточниот одговор и стимулирање на хронична инфламација [32,33].

Б) Возраст

Стареењето придонесува кон забавен процес на заздравување преку ослабена функција на имунолошкиот систем, задоцнета инфилтрација на воспалителни

клетки и редуцирана продукција на фактори на раст [34–36]. Иако способноста за заздравување не е целосно нарушена, постојат значајни разлики во одговорот на ткивата кај постари пациенти.

В) Стрес

Стресот има негативно влијание врз имунолошката функција преку активирање на хипоталамус-хипофиза-надбубрежна (НРА) оска и зголемено лачење на глюкокортикоиди [37–41]. Овие хормони делуваат имunosупресивно, ја редуцираат продукцијата на проинфламаторни цитокини ($IL-1\beta$, $IL-6$ и $TNF-\alpha$) и го нарушуваат нормалниот воспалителен одговор потребен за ефективно заздравување.

Г) Прекумерната телесна тежина/обезитност

Прекумерната телесна тежина е идентификувана како ризик фактор за задоцнето заздравување и постоперативни компликации. Дебелите лица имаат зголемен ризик за инфекции, декубитални рани и хематоми, делумно поради нарушена циркулација, хипоперфузија на масното ткиво и зголемена механичка напнатост на раната [42–45].

Д) Нутритивен статус и улогата на микронутриенти

Влијанието на исхраната врз заздравувањето на раните е тема на бројни истражувања во последниве стотици години. Недостатокот на нутритивни елементи (протеини, липиди, јаглехидрати, витамини и минерали) значајно го нарушува процесот на заздравување, особено во катаболни состојби после повреда или хируршка интервенција [46]. Во такви ситуации се јавува потребата од специјални суплементи.

Ѓ) Инфекции и воспалителни процеси

Механичкото нарушување на интегритетот на кожата, како резултат на траума или хируршка интервенција, овозможува пристап на микроорганизми (кои инаку се дел од нормалната кожна микрофлора) до подлабоките ткива. Присуството и репликативниот капацитет на овие микроорганизми се од клучно значење за

класификацијата на раната во една од следниве категории: контаминирана, колонизирана, локално инфицирана/критично колонизирана или инвазивно инфицирана [47].

Контаминацијата подразбира присуство на микроорганизми во раната кои не покажуваат активна репликација и не предизвикуваат оштетување на ткивото. Наспроти тоа, колонизацијата се карактеризира со активна пролиферација на микроорганизми во рамките на раната, без манифестација на видливи ткивни промени. Критичната колонизација претставува преодна фаза, во која се забележува микробна пролиферација со иницијален ткивен одговор, додека инвазивната инфекција се дефинира како состојба при која реплицирачките микроорганизми предизвикуваат структурни и функционални оштетувања кај ткивото на домаќинот [47].

Инфламаторниот одговор е суштински дел од нормалниот процес на заздравување на раната, овозможувајќи елиминација на патогените микроорганизми и стимулација на последователните фази на регенерација. Сепак, во услови на нецелосна или неадекватна дезинфекција, воспалителниот процес може да се пролонгира. Притисокот од присутните микроорганизми води до зголемена експресија на проинфламаторни цитокини, како што се интерлеукин-1 (IL-1) и тумор некрозен фактор-алфа (TNF- α), кои не само што го одржуваат воспалението, туку и го поттикнуваат растот на бактериите и продукцијата на ендотоксини.

Доколку воспалението перзистира, раната преминува во хронична состојба која е особено тешка за третман. Продолженото воспаление води до зголемена активност на матрикс металопротеази (MMPs) – ензими кои го деградираат екстрацелуларниот матрикс (ECM) и ја нарушуваат архитектурата на ткивото. Истовремено, се бележи намалување на концентрацијата на ендогени инхибитори на протеаза, што дополнително го нарушува физиолошкиот баланс неопходен за заздравување.

1.3 Микробиомот на кожата и улогата во настанувањето на хроничните рани

1.3.1 Микробиом на кожата и хроничните рани

Покрај бариерната и имунолошката функција, кожата е домаќин на комплексни микробни заедници кои формираат дел од кожната микробиота. Овие микробни заедници, познати под терминот микробиом, играат клучна улога во хомеостазата на кожата и во патогенезата на различни дерматолошки состојби, вклучувајќи и хронични рани. Микробиотата која е задолжителна за здравата кожа е составена од многу микроорганизми на кожата и скалпот, било да се коменсали или факултативни патогени. Микробиомот на кожата е дефиниран како геном на микроорганизмите кои се наоѓаат на кожата и со кои микроорганизмите имаат сложени односи [48,49]. Здравата кожна микробиота се состои од резидентни и транзиторни микроорганизми. Фиксната микробиота, која вклучува коменсали како *Corynebacterium*, *Propionibacterium* и *Staphylococcus*, доминира на здрава кожа, додека транзиторните микроорганизми престојуваат привремено [50, 51]. Четирите доминантни бактериски филуми се *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* и *Bacteroides* [52]. Микробниот состав зависи од анатомската локација, генетските фактори, навиките, животната средина и физиолошките услови [48,52].

Хроничните рани се дефинираат како рани со нарушено заздравување, чиј процес надминува 3–6 недели [53,54]. Инфекциите и формирањето на биофилм се меѓу главните фактори за забавено заздравување [55]. Современи некултурни методи откриваат дека хроничните рани може да бидат колонизирани од сложени микробни заедници, со честа појава на *Staphylococcus spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Corynebacterium spp.* и *Enterococcus spp.* [56–58].

Волкот и соработниците покажаа дека микробниот состав на раните е сличен без оглед на типот на рана или демографските фактори [56]. Сепак, транзицијата на микробиолошките заедници во времето се поврзува со позитивни исходи во заздравувањето [57]. Идентификување на корисни наспроти патогени организми е суштинско за прогнозата и таргетираната терапија [60]. Раните колонизирани со

факултативни анаероби се отпорни на хипербарна оксигенација, за разлика од оние со доминација на облигатни анаероби [61–64].

1.3.2 Микобиомот на кожата и хроничните рани

Иако бактериите се главен фокус во истражувањето на микробиомот, се повеќе се препознава улогата на габите – посебно во контекст на хронични рани [65]. *Malassezia spp.* доминира на повеќето кожни површини, додека во влажни региони се среќаваат *Candida*, *Aspergillus* и *Penicillium* [66,67]. Културно-независни студии покажуваат дека габите се присутни во повеќе од 80% од хроничните рани, со значајна застапеност кај дијабетичните улкуси на стопалата [67,68].

Candida spp., *Aspergillus spp.*, и *Trichosporon spp.* се најчестите габични патогени [68]. Калан и соработниците поврзуваат зголемената изобилност на *Ascomycota* со подолг процес на заздравување [57]. Габите често го колонизираат ткивото по антибиотска терапија, што укажува на интеракции меѓу бактериските и габичните компоненти на микробиомот [59]. PCR-базирани анализи открија дека *Candida parapsilosis*, *C. tropicalis*, и *C. albicans* се доминантни во дијабетичните рани, заедно со габи од родовите *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Alternaria* и други [59,70]. Daut и соработниците идентификуваа 48 различни видови габи, со *Candida albicans* и *C. parapsilosis* како најчести, а *Malassezia restricta* и *Curvularia lunata* биле присутни во повеќе видови рани [70].

Исто така, утврдено е дека постои негативна корелација меѓу *Staphylococcus* и *Candida*, со дополнителни врски меѓу микробниот состав и клинички параметри како дијабетес, пол и кардиоваскуларни болести [70,71]. Истражувањата упатуваат дека габичната компонента на микробиомот има потценето, но значајно влијание врз прогнозата и третманот на хроничните рани.

1.4. Биофилм кај хронични рани

Иако најголемиот дел од традиционалните истражувања во микробиологијата се фокусирани на планктонските, т.е. слободно лебдечки популации на микроорганизми, современите научни сознанија укажуваат дека мнозинството

бактерии, особено во природни и клинички средини, егзистираат во форма на биофилм [72]. Се проценува дека околу 99,9% од сите познати микроорганизми во природни услови се прикачени на површини, што обезбедува бројни предности, како зголемен пристап до хранливи материи и заштита од надворешни влијанија [73]. По прикачувањето на соодветна површина, бактериите започнуваат со синтеза на екзополимерна матрица, составена од полисахариди, протеини и нуклеински киселини [74–76], која го олеснува нивното задржување на површината и ја стабилизира нивната просторна организација.

1.4.1 Биофилм- дефиниција и структура

Биофилмот се дефинира како организирана заедница на микроорганизми кои се прикачени на површина или се меѓусебно сврзани, вградени во хидрирана матрица од екстрацелуларни полимерни супстанции (EPS), кои ги штитат од антимикробни агенси и од имунолошките механизми на домаќинот [77]. Структурно, биофилмовите се состојат од микробиолошки агрегати обвиткани во екстрацелуларен матрикс (ECM), составен претежно од EPS – полисахариди, протеини и гликопротеини [78,79].

Околу 80–85% од волуменот на биофилмот е составен од екстрацелуларниот матрикс, додека само 15–20% претставуваат микробните клетки [73]. EPS матриксот обезбедува механичка стабилност, медиум за ензимска активност, транспорт на хранливи материи и создавање на микросредини со специфични биохемиски својства.

1.4.2 Фази на развој на биофилмот

Развојот на биофилмот претставува динамичен процес кој се одвива низ пет фази, како што е опишано од Stoodley et al. [80]:

1. Реверзибилно прицврстување: почетна адхезија на микробите на површината преку структури како пили, флагели или специфични рецептори;
2. Неповратно прицврстување: стабилизирање на врската преку синтеза на EPS;
3. Клеточна пролиферација: формирање микроколонии;

4. Созревање: развој на тродимензионални структури со карактеристични канали и групации;
5. Дисперзија: ослободување на клетки со цел колонизација на нови локации.

Зрелиот биофилм често прикажува сложени архитектонски форми, како што се структури налик на кули од печурки и мрежи на водни канали, кои овозможуваат транспорт на хранливи материи и отстранување на метаболички отпад [80].

1.4.3 Улогата на кворум сензорирањето (Quorum Sensing) во биофилмот

Кворум сензорирањето (QS) е фундаментален механизам на клеточна комуникација кој овозможува популациска координација и регулација на гени поврзани со вирулентност и формирање на биофилмови. QS се одвива преку мали сигнални молекули наречени автоиндуктори (AI), кои при доволна концентрација активираат специфични гени [81–83].

Грам-негативните бактерии најчесто користат N-ацил-хомосерин лактони (AHLs), додека грам-позитивните бактерии продуцираат пептиди или AI-2 молекули. Кај *Staphylococcus aureus*, пептидниот QS систем вклучува AIP молекули кодирани од *agc* локусот, кој истовремено регулира и низа вирулентни фактори [84–86]. *Pseudomonas aeruginosa*, чест причинител на инфекции кај хронични рани, користи сложен QS систем кој координира продукција на ензими, пигменти и биофилм [87].

Кворум сензорирањето не само што го регулира однесувањето на бактериите, туку има и директно влијание врз клетките на домаќинот, инхибирајќи, на пример, пролиферација на лимфоцити [88]. Инхибиторите на QS (QSI – quorum sensing inhibitors) се идентификувани како потенцијални адјуванси во третманот на биофилмски инфекции, со можност за зголемување на чувствителноста на бактериите кон антибиотици [89].

1.4.4 Полимикробност на биофилмот

Биофилмовите во хроничните рани често содржат повеќе микробни видови, имаат полимикробна природа што води до зголемена отпорност на антимикробни агенси и потешкотии во третманот. Комбинирани инокулации од *S. aureus* и *P.*

Aeruginosa резултираат со зголемени стапки на инфекција во животински модели [90,91]. Дополнително, *Prevotella bivia* ја зголемува вирулентноста на *S. aureus* во коинфекција [92].

Истражувањата на Dalton et al. покажуваат дека полимикробните биофилмови составени од *Enterococcus faecalis*, *Fingoldia magna*, *P. aeruginosa* и *S. aureus* водат до забавено заздравување и значајна антимикробна толеранција [93].

Микробиомот на хроничните рани претставува комплексна и динамична заедница составена од различни бактериски и габични микроорганизми кои коегзистираат во форма на биофилм [59]. Интеракциите меѓу микроорганизмите од различни биолошки царства – бактерии и габи – можат да бидат синергистички или антагонистички, и нивното разбирање е клучно за развој на ефективни интервенции.

In vitro моделите обезбедуваат контролиран систем за анализирање на интеракциите помеѓу клинички релевантни бактериски и габични патогени. *Candida spp.* е често испитуван род на габи во вакви модели, со оглед на нејзината способност да воспоставува стабилни и структурно комплексни биофилмови заедно со бактериски патогени како што се *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Acinetobacter baumannii* и *Burkholderia cenocepacia* [94].

Габичните хифи на *Candida* се прицврстуваат за површините и создаваат подлога погодна за адхезија и развој на бактериски компоненти на биофилмот, што резултира со зголемена отпорност кон антимикробни агенси.

Интеракцијата помеѓу *Staphylococcus aureus* и *Candida albicans* е едно од најдобро документираните примери за синергистички полимикробен биофилм, особено кај пациенти со дијабетични улкуси на стопалата. Доказите покажуваат дека во присуство на *C. albicans*, толеранцијата на *S. aureus* кон антибиотици значително се зголемува. Овој ефект се должи на повисока продукција на екстрацелуларна ДНК и на габични компоненти на матриксот во биофилмот [95].

Дополнително, ко-инфекцијата води до зголемена продукција на бактериски токсини како резултат на активација на *agr* патеката за кворум сензорирање [96,97]. Оваа релација е би-дирекциона; *S. aureus* исто така ја унапредува експресијата на гени за биофилм и вирулентност кај *C. albicans* [98]. Така, синергистичките ефекти резултираат со стабилен, заштитен и особено патоген биофилм, кој е исклучително отпорен на третман.

Присуството на *C. albicans* во биофилмот на хронични рани е идентификувано како значаен фактор кој придонесува за антимикуробна толеранција. Габичните структури не само што го стабилизираат биофилмот, туку и ја штитат внатрешната бактерииска популација од ефектите на антимикуробните агенсии [99]. Овие наоди укажуваат на потенцијална вредност на антифунгалното таргетирање на габичниот скелет во биофилмот како дополнителен пристап во третманот на хронични рани.

Одредени бактерии можат да ја инхибираат габичната морфогенеза. *Streptococcus agalactiae*, на пример, покажал способност да ја инхибира формацијата на хифи на *C. albicans* преку редукција на експресијата на габични гени како што се *HWP* и *EFG* [100]. Спротивно на тоа, *C. albicans* може да ја зголеми колонизацијата на *S. agalactiae*, како што било покажано во модел на глушец [101].

Овие двонасочни интеракции ја комплицираат патогенезата и терапевтските стратегии, бидејќи присуството на една микроорганизам може да ја модулира вируленцијата и отпорноста на другиот.

Полимикробиолошката природа на биофилмот претставува сериозен клинички предизвик, со оглед на зголемената резистенција кон стандардни антибиотици и проширувањето на габични инфекции. Современите истражувања препорачуваат користење на комбинирани терапии – синергистичка антифунгална и антибактериска терапија – како што се флуконазол, амфотерицин Б и системски или топични антибиотици со широк спектар на дејство [102].

Полимикробните биофилмови, особено оние составени од бактерии и габи, играат критична улога во хроничноста и терапевтската отпорност на раните.

Интеракциите помеѓу *S. aureus* и *C. albicans* служат како парадигма за разбирање на меѓусебната регулација на вирулентност и биофилмска стабилност. Препознавањето и насоченото третирање на овие полимикробни заедници, особено преку инхибиција на габични компоненти, отвора нови можности за унапредување на третманот на хронични рани.

1.4.5 Биофилм и процес на заздравување на раните

Биофилмот претставува значаен фактор кој негативно влијае врз сите фази на процесот на заздравување на раните, директно или индиректно. Сепак, неговото најизразено дејство се манифестира за време на воспалителната фаза [103]. Имунолошкиот одговор на домаќинот, особено оној медиран преку полиморфнонуклеарните клетки (PMN), е компромитиран во присуство на биофилм, што резултира со одложено заздравување и хроничитет на раните.

Истражувањето на Jensen et al. [104] покажало дека активноста на PMN клетките е значително намалена во присуство на биофилм формиран од *Pseudomonas aeruginosa*, во споредба со планктонските бактерии. Употребата на хемилуминисцентен тест покажала дека бактериските клетки во биофилмот се помалку подложни на уништување. Истовремено, не било можно да се утврди точниот процент на бактерии кои биле во директен контакт со PMN клетките.

Дополнителни истражувања од истата група [105] покажале дека рамнолипидите – QS молекули продуцирани од *P. aeruginosa* – брзо индуцираат некроза на PMN клетките. Ова укажува на тоа дека контактот клетка-клетка не е неопходен за инхибиција на имунолошкиот одговор; биомолекулите сами по себе се доволни за медијација на ефектот. Покрај тоа, рамнолипидите можат да ја блокираат фагоцитозата, делувајќи како физичка бариера [106].

McClure и Schiller [107] пријавуваат дека рамнолипидите предизвикуваат деформација на мембраната на макрофагите и го инхибираат нивното врзување со бактериите, што резултира со намалена фагоцитоза и интрацелуларно уништување на патогените. Schooling и Beveridge [108] исто така укажуваат дека липополисахаридите (LPS) од грам-негативни бактерии, иако индуцираат

хемотакса, имаат негативно влијание врз функцијата на неутрофилите преку промени на мембранскиот фосфатидилсерин.

Поради променетиот фенотип и метаболизам на бактериите во биофилмот, тие стануваат отпорни на уништување од страна на имуниот систем. Опишани се две патофизиолошки варијанти: (1) силно вирулентните бактерии предизвикуваат некроза за обезбедување нутриенти [109]; (2) компоненти како ДНК и LPS индуцираат хемотакса и проинфламаторни цитокини, создавајќи хиперинфламаторна состојба [110].

Егзополисахаридите (EPS) во биофилмот ја инхибираат опсонизацијата и ја заробуваат активноста на цитокини [111]. После фагоцитоза, неутрофилите не се ефикасно распознаени од макрофагите, што води до нивна неконтролирана деградација [112,113]. Ова доведува до ослободување на еластаза и матрикс металопротеинази (MMPs), кои го разградуваат екстрацелуларниот матрикс [114]. Анаеробните услови во длабочината на биофилмот го компромитираат оксидативниот одговор на неутрофилите [103], додека кратковерижните масни киселини продуцирани од *Bacteroides* ја инхибираат продукцијата на лизозим [115].

Имунолошкиот систем станува неспособен да премине од вроен кон адаптивен имунитет, а хроничната инфламација предизвикува исцрпување на ткивото и одложено заздравување [116].

Кај акутни рани, миграцијата на кератиноцитите започнува веднаш по повредата [117]. Во хронични рани, и покрај клеточната пролиферација на рабовите, нивната миграција е инхибирана [118]. Причините може да се поврзат со хипоксија [119], зголемена протеазна активност [120] и клеточно стареење [121].

Kirker et al. [122] покажуваат дека *Staphylococcus* биофилмот значително ја намалува миграцијата и преживувањето на кератиноцитите во *in vitro* модел, предизвикувајќи морфолошки промени и нуклеарна фрагментација. Сепак, не е утврдено дали инхибицијата на миграцијата е директно последица на намаленото преживување.

Loryman и Mansbridge [123] откриваат дека LPS молекулите од *P. aeruginosa* и *E. coli* ги инхибираат миграцијата и индукцијата на апоптоза на кератиноцитите, ефект кој може да се блокира со TLR-2 и TLR-4 антитела, што укажува на вклученост на TLR патиштата.

Во in vivo модел, Schierle et al. [124] забележале дека присуството на *Staphylococcus* биофилм значително ја одложува реепителизацијата. Инхибиција на QS преку RNAIII инхибиторен пептид го враќа нормалното заздравување, укажувајќи на важноста на QS молекулите во патогенезата. Marano et al. [125] анализираше условени раствори од *Staphylococcus* и *Pseudomonas* биофилмови и нивното влијание врз кератиноцитите. Двата раствора биле цитотоксични на високи концентрации и ја инхибирале пролиферацијата, но само *S. aureus* инхибирал миграција. Протеомската анализа укажала дека токсичноста на *Staphylococcus aureus* била медирана од протеин, а на *Pseudomonas aeruginosa* од мала молекула.

Биофилмот има комплексно, мултифакторско влијание врз сите аспекти на заздравување на раните. Неговото присуство ја одржува воспалителната фаза, ја нарушува имунолошката регулација, ја компромитира фагоцитозата и го инхибира префрлањето кон фазите на реепителизација и реконструкција. Инхибицијата на миграцијата и пролиферацијата на кератиноцитите.

1.5 Дијагностички процедури за биофилм кај хронични рани

1.5.1 Критериуми за клиничка дијагноза на биофилм во хронични рани

Првите критериуми за клиничка идентификација на биофилм-инфицирани рани беа воспоставени од Светскиот симпозиум за биофилм во 2012 година. Клучните индикатори предложени во оваа рамка се: (1) бледо, едематозно дно на раната; (2) фрагилно гранулационо ткиво; (3) значајни количини на жолтеникав ексудат; (4) присуство на некротично ткиво; (5) болка во пределот на раната и (6) непријатен мирис [126].

Овие критериуми беа ревидирани во 2017 година. Новите консензусни упатства наведуваат дека присуство на биофилм е веројатно доколку се забележат: (1) неефикасност на антимикробна терапија; (2) одложено или изостанато здравување; (3) повторувачки инфекции; (4) ексцесивен ексудат; (5) умерено воспаление и (6) знаци на црвенило и оток [127].

Според Светската федерација на здруженија за здравување на рани (2019), веројатност за присуство на биофилмот постои ако ранта ги има следниве карактеристики: (1) недостаток на одговор на антимикробна терапија; (2) пролонгирано здравување со релапс по суспендирање на антибиотици; (3) бледо, отечено дно со жолт секрет и непријатен мирис; (4) позитивен одговор на дијагностичка терапија со редовен дебридман, антимикробни преврски и соодветна антимикробна фармакотерапија [128].

И покрај постојните клинички критериуми, нивната научна валидност сè уште бара потврда преку високо-квалитетни студии, како што се рандомизирани контролирани клинички испитувања [129].

1.5.2 Современа дијагностичка методологија за биофилм во хронични рани

Ефективната дијагностика се заснова на два аспекти: локализација на биофилмот и идентификација на вклучени патогени. Препорачано е земање биопсија од дното на раната, бидејќи површинските брисеви не секогаш го рефлектираат вистинскиот микробиолошки состав [130,131]. Дијагностичките методи можат да се поделат на морфолошки, микробиолошки и молекуларни пристапи. Засега, не постои златен стандард за дијагностика на биофилм во хронични рани [132].

А) Морфолошки тестови

Биофилмот е тешко видлив со голо око бидејќи најчесто е помал од 100 μm [133]. Некротичното ткиво често погрешно се идентификува како биофилм. Хистолошки анализи покажуваат присуство на бактерии и биофилм во рани и есхари [134]. Како што сугерираат неколку клинични водичи, препорачана дијагностичка метода е испитувањето на ткиво од раната добиено со дебридман

[131]. Со оглед на тоа што биофилмовите се распределени хетерогено низ основата на раната и есхарите, треба да се земат повеќе примероци од површинските и длабоките слоеви на раната за да се зголеми осетливоста на оваа дијагностичка метода. Недостатокот на помалку инвазивниот метод, микробиолошки брис од рана е неможност секогаш точно да се лоцира биофилмот и да се земе материјал од соодветното место, поради фактот дека не постојат објективни клинички знаци за лоцирање на биофилм [135]. Хистологијата може да даде лажно негативни резултати, во зависност од локацијата на биопсија [136]. Алтернативи со поголема точност се скенирачката електронска микроскопија (SEM) и конфокалната ласерска микроскопија (CLSM) [130], иако тие се ограничени во рутинската клиничка примена поради потребата од специјализирана опрема и кадар.

Б) Микробиолошки тестови

Класичните култури имаат ограничена ефикасност бидејќи во биофилмот често се наоѓаат бактерии во стационарна или VBNC (viable but non-culturable) состојба [137–140]. Биофилмовите создаваат средина која предизвикува метаболичка латентност и антимикробна отпорност [141–143]. Традиционалните култури идентификуваат само околу 1% од микроорганизмите во биофилм [139]. Традиционалната методологија на култивирање идентификува само 1% од бактериите во хроничните рани, бидејќи стапката на култивирање е под влијание на состојбата на бактериите [139]. Биофилмовите содржат голем број клетки во стационарна фаза (фаза на бавно растење или стационарна фаза во циклусот на раст на бактериите) поради стресни услови во микрооколината [140]. Познато е дека овие бавно растечки бактерии влегуваат во статус на витални, но некултивирачки (VBNC) бактерии, што може да биде адаптивен механизам на бактериите кои живеат во стресни услови на животната средина, како што се изложеност на антимикроби, низок рН, хипоксија и/или недостаток на нутриенти [141,142]. Бактериите во центарот на структурата на биофилмот се смета дека “гладуваат” односно се со намалена метаболичка функција, и оваа реакција на глад резултира со отпорност кон антибиотици [143]. Со оглед на тоа што висок процент на клетки во биофилмот можат да ја покажат оваа латентна состојба, култивирањето на патогените микроорганизми во биофилмот користејќи

конвенционални техники е навистина предизвикувачко. Култивирањето е дополнително комплицирано кај полимикробните биофилмови. Слично, VBNC бактериите не можат да се култивираат на конвенционални агар плочи, што имплицира ниска стапка на детекција со овие конвенционални техники [140]. Сепак, VBNC бактериите може да се култивираат под специфични услови, како што се стрес од температура и глад. Методи како соникација или додавање дитиотреитол значително ја зголемуваат чувствителноста и специфичноста на дијагностиката во други типови инфекции [144,145], но нивната применливост кај хронични рани сè уште не е потврдена.

В) Молекуларни тестови

Молекуларната дијагностика, особено 16S rRNA базирано секвенционирање, овозможува детекција на некултивирачки бактерии [146]. Техниката на денатурациона гел електрофореза (DGGE), во комбинација со 16S PCR, открива бактерии кои остануваат недетектирани преку конвенционални методи [147].

Комбинирани пристапи како PRAPS, FRACS и PRADS обезбедуваат длабинска анализа на микробиомот [148]. Флуоресцентната хибридизација *in situ* со пептидно-нуклеински киселини (PNA-FISH) нуди поголема специфичност и чувствителност во споредба со традиционалните FISH техники [149–151]. Сепак, и покрај ветувачките резултати, молекуларната методологија не може да ги разликува вистинските патогени од контаминација [148]. Потребата од стекнување на соодветни примероци на ткиво од инфицирани рани за анализа исто така ја отежнува оваа техника [148].

1.5.3 Нови дијагностички техники

Повеќето тековни дијагностички методи за биофилм кај хронични рани започнале како транслациски апликации на техники што се користат во проучувањето на биофилмовите во животната средина. Продолжувањето на оваа тенденција веројатно ќе донесе корисни клинички апликации за детектирање на биофилм кај хронични рани. Две такви техники со голем потенцијал се wound blotting и транскриптомски пристапи.

Wound Blotting е нова неинвазивна метода која користи нитроцелулозни мембрани за апсорпција на биомолекули директно од дното на раната. Таа овозможува квалитативна и просторна анализа на молекули кои се индикативни за биофилм [152].

Транскриптомските пристапи преку RNA-seq, овозможуваат анализа на експресираниот геном и го идентификуваат метаболичкиот статус на микроорганизмите [153]. Оваа метода може да идентификува бактерии, нивната тенденција за биофилм-формација и нивото на антимикробна резистенција.

Идентификацијата на биофилм во хронични рани е сложен и мултидисциплинарен процес. Иако постојат клинички критериуми и дијагностички методи, секој од нив има ограничувања. Морфолошките, микробиолошките и молекуларните техники нудат комплементарен пристап кон детекцијата. Иднината на дијагностиката лежи во развојот на комбинирани, чувствителни и неинвазивни методи како што се wound blotting и транскриптомски анализи, со цел навремено и прецизно управување со хроничните рани.

1.6 Терапија на биофилм кај хроничните рани

Биофилмот во контекст на хронични рани претставува сериозен терапевтски предизвик, поради неговата сложена структура, микрооколината на раната и фенотипските особености на бактериите вклучени во неговиот состав. Овие карактеристики му овозможуваат на биофилмот да биде исклучително отпорен на антибиотици и антимикробни агенси, што бара примена на иновативни стратегии за негово таргетирање и елиминирање [154].

1.6.1 Терапевтски модалитети насочени кон микроорганизмите

а) Терапија со бактериофаги

Бактериофагите, природни вирусни предатори на бактериите, покажуваат голем потенцијал во третманот на биофилмот преку [154]:

- Висока специфичност кон бактериите-домаќини;

- Продукција на фаг-ензими (полисахарид деполимерази, алгинози) со капацитет за деградација на екстрацелуларната матрица;
- Способност за автопропагирање и лиза на бактериските клетки;
- Потенцијална синергија со антибиотици и намалување на антибиотската резистенција.

И покрај овие предности, потребни се дополнителни истражувања за да се утврди нивната безбедна и ефективна клиничка примена.

б) Нано-антибактериски агенси и метали

Наноматеријалите се особено ефективни поради способноста да ја преминат биофилмската бариера, при што демонстрираат антимикробна активност (среброто) и потенцијална синергија со други терапевтски модалитети (на пр. магнетна хипертермија). Ин витро и ин vivo студиите покажале дека среброто го инхибира и раниот и зрел биофилм [155,156]. Антимикробната способност со широк спектар на овие формулации потекнува од нивната способност да се врзат за бактериските структури и да ја дестабилизираат интермолекуларната адхезија. Покрај употребата на наночестички, последните истражувања користат и нано-хибридни ензими со цел да активираат реактивни кислородни видови [156,157]. Металите како сребро, цериум и галиум покажуваат директно дејство врз биофилмот, но нивната цитотоксичност при високи концентрации ја ограничува клиничката употреба [157,158].

Друга метода за зголемено доставување на антимикроби на местото на раната е преку имплантирање на биоматеријал кој содржи посакувани антимикробни агенси. Импланти со биоматеријали кои ослободуваат антимикробни агенси покажуваат ефикасност во контролата на биофилмот во инфекции поврзани со коскени и меки ткива [159].

в) Фототерапија со сина светлина

Неколку студии покажале позитивни бенефити на фотобиомодулацијата во здравувањето на рани. Иако биолошките механизми сè уште не се целосно разбрани, студиите покажале дека видливата светлина во опсегот од 400 nm до 500

nm има антимикробен и анти-биофилмски ефект [160]. Халстејд и соработниците во нивната ин витро студија го тестираше синото светло против планктонски и биофилмски бактерии и покажале значителна бактериска осетливост на третманот со сина светлина [161]. Интересно е да се напомене дека Грам-позитивните бактерии се помалку подложни, а ефектот врз постариот биофилм сè уште е предмет на дебата. Лесната администрација, минималните несакани ефекти, дејството против широк спектар на микроорганизми и низок потенцијал за развој на толеранција го прават овој модалитет поволен во управувањето со хронични биофилмови.

г) Инхибитори на кворум сензорирањето (QS)

Инхибирањето на кворум сензорните патишта може да го спречи формирањето на биофилм и да ја намали вирулентноста на бактериите. Студиите покажале дека хлорната киселина го намалува оптоварувањето со бактерии и го забрзува заздравувањето во модел на рана кај глушец со инфекција од *P. aeruginosa* преку QS [162]. Кај *S. aureus*, докажано е дека QS е инхибиран од страна на пептидот кој го инхибира RNAPII (RIP) и неговите деривати [163,164]. QS инхибиторите, поради својот изразен синергистички ефект со антибиотици, можат да се користат како дополнителни агенси за зголемување на осетливоста на биофилмовите на антимикробни средства [165]. Сепак, нивните токсични ефекти на клетките на домаќинот при концентрации со кои дејствуваат [166,167] и намалената ефикасност во ин vivo моделите го ограничуваат нивното користење во секојдневната пракса во моментот [168]. Во овој контекст, полифенолната фитохемикалија, куркумин, е широко проучувана како анти-биофилмски агенс. Куркуминот дејствува така што го инхибира QS системот и го нарушува формирањето на биофилмот преку инхибирање на бактериската адхезија на рецепторите на домаќинот [165]. Неколку нано-формулации кои вклучуваат куркумин се достапни за примена како на површините на рани така и на уредите за имплантација за спречување на формирање на биофилм.

д) Ензимска деградација на матриксот

Употребата на ензимите ДНаза I, Дисперсин Б (DspB) и α -амилаза за деградација на сложената структура на биофилмот овозможува зголемена пенетрација на антибиотици и со тоа ја зголемува нивната ефикасност [169,170]. Оваа нова стратегија за деградација на биофилм не само што го инхибира формирањето на биофилм, туку и ја нарушува зрелата биофилмска структура на *S. aureus*, *Vibrio cholerae* и *P. aeruginosa* [171]. Трошоците за синтетизирање на чисти ензими за клиничка примена ја прават оваа метода скапа и ја ограничуваат нејзината примена во пракса. Сепак, комбинирањето на ензими за деградација на биофилмската матрица и антибиотици е многу ефикасно средство за отстранување на биофилм [172].

ѓ) Антимикробни пептиди и природни соединенија

Антимикробните пептиди се позитивно наелектризиран пептиди, кои имаат должина од 15–30 аминокиселини и ги продуцираат бактериите и габите. Тие се врзуваат за негативно наелектризираните структурни молекули на микробната мембрана и на тој начин дејствуваат со широк спектар на антимикробна активност [173]. Главната предност е нивната способност да дејствуваат на бавно растечките, не-мултиплицирачки бактерии, кои што се наоѓаат во биофилмовите. Способноста да се модифицираат нивните примарни аминокиселински секвенци за да се зголеми нивната ефикасност и стабилност ги прави привлечни анти-биофилмски агенси [174]. Сепак, нивната зголемена осетливост на рН на телесните течности, протеолитична активност и јонска сила ја прави нивната клиничка примена предизвик [173]. Природни и растителни деривати исто така се користат како превентивни мерки против биофилмовите. Медот манука покажува мултимодален антимикробен ефект и има влијание на експресијата на гени кај MRSA [158,175].

е) Ултразвучна терапија

Иако ултразвук со ниска фреквенција не е ефикасен самостојно во ерадикацијата на бактериите во состав на биофилмот, може да се комбинира со антибиотици за да се зголеми транспортот на антибиотите низ биофилмот преку

зголемување на осетливоста на биофилмот на антимикробни агенси [176]. Студиите покажале дека оваа комбинација помага во зголемено уништување на биофилмовите поврзани со *P. aeruginosa* и *S. aureus*, како и оние предизвикани од резистентните соеви на *E. coli* [177,178]. Употребата на ултразвучна терапија е ветувачка неинвазивна метода за намалување на бактериското оптоварување.

ж) Електрични и електрохемиски пристапи

Електростимулацијата и електрофармацевтските агенси поттикнуваат реепителизација и нарушување на биофилмот преку нискоенергетски механизми, со ниска цена и добар безбедносен профил [173,179].

1.6.2 Терапевтски пристапи насочени кон микрооколината на раната

а) Модификација на рН

рН на дното на раната се поместува од киселински во алкален, потоа неутрален и повторно киселински како што раната заздравува [180,181]. Студиите покажале дека неуспехот во заздравувањето на повеќето акутни и хронични рани е поврзан со алкалното рН од 7,15 до 8,9 [172,182]. Раните кои не заздравуваат поради продолжена воспалителна фаза се исто така изложени на зголемена активност на протеази кои зависат од рН на околината. Третманите со топикални раствори на оцетна киселина [183], полиакрилна киселина и полиакрилатни винилни смоли се користат за проучување на ефектот на заздравување на раните. Се смета дека постигнување кисела средина во раната, како вид на адјувантна терапија, го контролира *P. aeruginosa*, кој е присутен во 40% од хроничните рани и често е резистентен на антимикробна терапија [184].

б) Терапија со негативен притисок (NPWT)

Терапијата со негативен притисок на рани (NPWT) применува континуиран или интермитентен суб-атмосферски притисок на површината на раната. Во моментот, ова е стандардна нега за третман на хронични рани. NPWT може да помогне во заздравувањето на раните преку зголемување на перфузијата на ткивата и да

помогне во создавањето на гранулационо ткиво со намалување на ексудатот, едемот и бактериската контаминација [185]. Последните истражувања сугерираат дека NPWT со инстилација на антимикробни агенси, како што е разредена хипохлорна киселина, придонесува за значително намалување на бактериското оптоварување на раната и на тој начин покажува ветувачки резултати во рани со зрел биофилм [186]. Со дополнителната предност на отсуство на развој на бактериска резистенција, оваа техника во комбинација со топикални антисептици е идеална за третман на хронични рани.

в) Хипербарна кислородна терапија (НВОТ)

НВОТ е терапија во која ткивата се снабдуваат со 100% кислород под атмосферски притисок со цел да се зголеми парцијалниот притисок на кислород во циркулацијата и на тој начин да се зголеми неговиот доток до дното на раната. Таа помага во заздравувањето на раните преку подобрување на оксигенацијата, намалување на воспалението и поттикнување на неоваскуларизација [187]. Ова терапија постигнува антимикробен ефект преку индуцирање на оксидативен стрес и модулација на имунолошкиот систем на домаќинот. Исто така има синергистичко дејство со антибиотиците, со што се засилуваат нивните ефекти [188,189]. Со речиси никаква веројатност за развој на бактериска резистенција, ефикасноста на НВОТ како адјувантна терапија против биофилмот е ветувачка.

г) Површински активни супстанции (сурфактанти)

Сурфактантите овозможуваат дисперзија на биофилмот преку дестабилизација на EPS, претварање на бактериите од биофилмот во планктонски фенотип и зголемување на чувствителноста кон антибиотици.

1.6.3 Комбинирани терапии

а) Пробиотици

Пробиотиците модулираат имун одговор и го заменуваат патогенот преку конкурентна инхибиција. Валенцка и соработниците во своето истражување правеле проценка на способноста на супстанциите добиени од *Lactobacillus*

acidophilus да инхибираат формирање на биофилм на *S. aureus* и *S. Epidermidis* и заклучиле дека инхибицијата на бактериското прикачување на површината и нарушувањето на биофилмот се случува преку влијание на интеракциите меѓу клетка-клетка и клетка-површина [190]. Иако резултатите од лабораториските студии се ветувачки, сè уште има долг пат до откривање на идеален пробиотик кој може да се користи клинички како средство против создавање на биофилм.

б) Мезенхимални Матични Клетки (MSC)

Мезенхималните матични клетки (MSC) поради нивниот антимикуробен ефект имаат огромен потенцијал за третман на хронични рани. Тие имаат антиинфективно дејство, и тоа го реализираат преку директни и индиректни механизми. Нивната способност да секретираат антимикуробни пептиди, како и да модулираат про- и анти-воспалителни имунолошки одговори, предизвикаа интерес за нивниот терапевтски потенцијал во хронични рани со биофилм [191]. Веројатно, најсилниот доказ потекнува од студијата на Џонсон и соработниците кои ги проучувале ефектите од администрацијата на MSC во кучешки модели на рани инфицирани со биофилм, и заклучиле дека најдобар исход се постигнал со ко-администрација на активирани MSC со антибиотици [192]. Вуд и соработниците покажале дека мезенхималните матични клетки добиени од човечко масно ткиво (AT-MSC) го инхибирале растот на *S. aureus* и *P. aeruginosa*, што било припишано на секреција на антибактериски фактори, зголемена фагоцитоза и намалена бактериска адхезија [193]. Нивниот потенцијал за диференцијација и способноста да го забрзаат процесот на заздравување на рани преку поттикнување на ангиогенеза и намалување на формирањето на лузни ги прави ветувачки алатки. Сепак, хетерогеноста во нивната подготовка, субоптималната подготовка на дното на раната, виталноста на клетките и потребата од поголеми контролирани клинички испитувања за осигурување на безбедноста ја ограничуваат нивната широка клиничка употреба.

1.6.4 Актуелен клинички консензус

Бидејќи биофилмот е невидлив за голо око, идентификацијата на “клиничките знаци” на биофилмот му овозможува на лекарот полесно препознавање и

отпочнување со третман. Ставот на Светската унија на здруженија за заздравување на рани (WUWHS) укажува дека “сите не-заздравувачки хронични рани потенцијално содржат биофилмови” и инсистира дека лекувањето на таквите рани треба да биде насочено кон нарушување на биофилмовите и превенција на нивната повторна формација [194]. Друг консензусен документ исто така укажува на слични набљудувања и предлага холистички пристап [195]. Сепак, треба да се признае дека повеќето од студиите за третман на хронични рани со биофилм покажале намалување на биомасата или биотоварот на раните наместо елиминација на биофилмовите. Тоа значи дека целосната елиминација на биофилмовите е исклучително тешка. Затоа, релевантно прашање е дали се очекуваат подобри резултати во заздравувањето на рани по намалувањето или по целосната елиминација на биофилмовите. Додека студиите покажуваат дека одговорите на лекувањето значително се зголемуваат дури и по намалувањето на големината на биофилмовите, повторното појавување или реформација на биофилмовите претставува вистински предизвик. Бидејќи формирањето на биофилмот вклучува постојана рамнотежа помеѓу планктонските бактерии и бактериите поврзани со биофилмот, се претпоставува дека намалувањето на било која популација на клетки помага да се насочи балансот кон имунолошките фактори на домаќинот. Сепак, како што бактериската еволуција е побрза отколку што се очекуваше, може да има други нови стратегии за надмудрување на овој пристап. До додатни докази кои ќе го поддржат ова, потпирањето на холистички пристап е подобар начин за справување со биофилмови на рани. Лекувањето на рани базирано на биофилм (BBWC) е холистички пристап за третман на рани со биофилм, со акцент на почетниот агресивен дебридман и чистење за да се намали биофилмскиот товар како и да се зголеми антимикробната подложност [196]. Откако ќе се отстрани некротичното, девитализирано ткиво и ќе се подготви дното на раната, процесот на намалување обезбедува превенција на микробиолошка реконтаминација и последователна реформација на биофилмот. Ова може да се постигне користејќи топикални антимикробни средства и соодветни лепенки. Во случај раната после 4 недели од избраното лекување да не рагира на третманот, пациентот и раната треба повторно да се проценат и да се планира алтернативна стратегија на лекување.

А) Превенција на формирање на биофилм

Превенција на прикачување со агенси како манозиди, EDTA, мед и лактоферин кои го инхибираат примарното прикачување на бактериите [197–202].

Превенција на созревање со бактериофаги, наночестички и ензими кои го инхибираат создавањето на микроколони и матрикс.

Дисперзија со молекули како D-амино киселини и норспермидин кои го поттикнуваат биофилмот да се претвори во планктонски фенотип [199–205].

Б) Дисрупција(разорување) на биофилмот

За процесот на заздравување на раната да напредува без проблеми, дното на раната мора да биде добро перфузирано, влажно, без некротично ткиво и без инфекција. Прецизната грижа за раната со редовна тоалета, дебридман и лепенки може да помогне во отстранување на упорниот биофилм и да го промовира формирањето на здраво гранулационо ткиво и реепителизација.

Редовно чистење/иригација на раната треба да биде дел од рутинскиот третман на рани. Ова е за отстранување на некротичниот материјал и намалување на бактериолошкиот товар. Најчесто доволно е иригирање под низок притисок со помош на балон шприц. Но за силно контаминирани рани се смета дека подобра е пулсна иригација под висок притисок со употреба на стерилен физиолошки раствор.

Дебридманот на рани го олеснува одвојувањето на некротичното ткиво од дното на раната. Ова може да се постигне на различни начини, како што се остар, механички, автолитичен и ензимски дебридман [206]. Остар дебридман, иако е ефективен и брз за намалување на бактериолошкиот товар и за стимулирање на здраво гранулационо ткиво, има голем недостаток, а тоа е болката. Автолитичниот дебридман е природен метод при кој протеолитичките ензими во ексудатот на раната го отстрануваат некротичното ткиво од дното на раната. Овој природен процес може да се засили со користење на семи оклузивни преврски кои ја

одржуваат раната влажна долго време. Иако лесно се изведува, главниот недостаток на оваа техника е времето потребно за постигнување задоволителни резултати и висок ризик од раст на анаеробни микроорганизми што бара често следење.

Ензимски дебридман е уште еден начин за разградба на протеините во изумреното ткиво, додека пак здравото ткиво под него останува неопштетено. Комерцијално достапните колагеназа и папаин се два широко користени агенси. Иако се бавни и ефективни на рани со минимално некротично ткиво, тие обично се користат во додаток на хируршки дебридман [207].

В) Спречување на повторно формирање

Примена на антимикробни средства (мед, јод, РНМВ, оцетна киселина) за продолжено делување и спречување на реформација на биофилмот.

Биофилмот се карактеризира со зголемена толеранција кон антимикробни агенси, што значително ја отежнува терапијата. Често, ин витро антимикробната сензитивност не корелира со клиничката ефикасност. Локалната апликација на антибиотици овозможува постигнување на високи концентрации на местото на инфекција со минимални системски ефекти, што ја прави особено корисна кај аваскуларни ткива. Дополнително, може да има улога и во третманот и во превенцијата на биофилмски инфекции [209].

Сепак, повеќето докази за локална терапија потекнуваат од ин витро студии, кои често не се апликативни во клиничка пракса [210]. При оваа терапија треба да се земе предвид концептот на минимална биофилм ерадикациона концентрација (МБЕС), која се намалува со продолжена изложеност на антибиотик, но сè уште недостигаат клинички потврдени податоци [211].

Иако не постои "златен стандард" за третман на биофилмот, интегрираната стратегија BBWC, со фокус на превенција, разорување и спречување на реформација, покажува најголем потенцијал во клиничка практика. Редовната проценка на клиничките знаци, како намалување на инфекцијата и некрозата, е клучна за евалуација на успехот. Препорачливо е третманите да се спроведуваат

најмалку две недели пред да се донесе заклучок за нивната ефикасност [212]. Понатамошни истражувања се неопходни за стандардизација на протоколи и прецизна проценка на ефективноста на секој терапевтски модалитет.

1.7 Антибиотска резистенција кај биофилм

Антибиотската резистенција претставува едно од најзначајните предизвици при третманот на инфекциите предизвикани од биофилм. Имено, биофилмот покажува исклучителна толеранција и отпорност кон антибактериските агенси, што сериозно ја намалува ефективноста на конвенционалната антимикуробна терапија. Толеранцијата се дефинира како привремена способност на клетките во биофилмот да преживеат високи концентрации на антибиотици или биоциди, главно преку инхибиција на метаболичката активност и премин во латентна фаза.

Таквиот фенотипски облик е присутен кај т.н. „перзистентни клетки“, кои иако се метаболички инертни, можат да се реактивираат и да ја продолжат колонизацијата по прекин на терапијата. Овие клетки претставуваат значаен механизам на преживување на бактериите во биофилмот [213]. Малите колонијални варијанти (SCVs) на *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa* се често изолирани од клинички примероци и укажуваат на нивната способност за упорност во внатреклеточната средина на домаќинот [213]. Микроорганизмите во биофилмот можат да бидат 10–1000 пати поотпорни на антибактериските агенси во споредба со нивните планктонски (слободно пловечки) форми [213]. Иако овој феномен е добро документиран, молекуларните механизми кои стојат зад него сè уште не се целосно разјаснети. Повеќе механизми се предложени како фактори на отпорност, вклучувајќи дифузиска бариера, метаболичка инерција, активирање на стрес-респонзивни гени и кворум сензорирање.

1.7.1 Механизми на Отпорност

Полисахаридната матрица на биофилмот претставува физичка **бариера за дифузија** која го ограничува навлегувањето на антимикуробните супстанции. De Beer и соработниците утврдиле дека ограничениот пенетрација на хлорин р-р во матриксот значително ја намалува неговата ефикасност [214]. Слично, Dunne и

колегите, користејќи ин витро модел на дијализен сад, покажале дека и покрај примената на ванкомицин и рифампицин, не се постигнува целосна стерилизација на *Staphylococcus aureus* биофилмот, што упатува на постоење на дополнителни механизми на отпорност [215]. Во друго истражување, Anderl и соработниците покажале дека и покрај целосна пенетрација на ампицилин и ципрофлоксацин, биофилмот демонстрира зголемена отпорност на дивите и мутантните соеви [216].

Ограничувањето на хранливите материи во зрелите биофилмови води кон премин на бактериите во фаза без раст, што ги прави помалку подложни на дејството на антибиотици [217]. Студиите покажуваат дека антибактериската ефикасност е во корелација со брзината на раст – бавно растечките клетки покажуваат значително зголемена отпорност [218–220].

Физиолошките адаптации на клетките во биофилмот често се резултат на **општата стрес реакција**, предизвикана од промени во температурата, рН вредноста или присуството на хемиски агенси [221,222]. Клучна улога игра RpoS – генот што кодира сигма фактор кој ја модулира стрес реакцијата кај *Escherichia coli*. Неговата инактивација резултира со значајни промени во клеточната густина и морфологија на биофилмот [223].

Кворум сензорирање(QS) претставува механизам на комуникација помеѓу бактериските клетки, преку кој се регулира генската експресија во зависност од клеточната густина. Davies и соработниците укажале дека мутација во QS кај *P. aeruginosa* резултира со формирање на структурно различни биофилмови кои се чувствителни на биоциди [224]. И покрај тоа, некои студии покажуваат дека антибиотската резистенција може да остане незасегната во QS-дефектни соеви [225], што укажува на потреба од дополнителни истражувања.

Бактериите при прикачување на површини ја активираат експресијата на специфични гени кои водат до појава на **биофилм-специфичен фенотип**. Овој фенотип се карактеризира со активирање на пумпи за излачување на повеќе лекови (multi-drug efflux pumps), како и со промени во надворешните мембрански протеини, што дополнително го зајакнува отпорот кон антимикробните агенси [226–229].

Отпорноста на биофилмовите кон антибактериските агенси е мултифакторски феномен, кој вклучува физички бариери, физиолошки и генетски адаптации. Овие механизми не функционираат изолирано, туку дејствуваат синергистички за да обезбедат преживување на микробните заедници дури и во услови на агресивна терапија. Затоа, идните терапевтски пристапи треба да се насочат кон повеќестрани стратегии кои ќе ги таргетираат различните нивоа на резистенција во рамки на биофилмот.

2.0 МОТИВ

Хроничните рани претставуваат значаен клинички и јавно-здравствен предизвик, поради нивниот долготраен тек, високи трошоци за третман и влијание врз квалитетот на животот на пациентите. Сè поголемиот број докази упатуваат на тоа дека микробиолошкиот профил на овие рани, особено присуството на биофилм и антимикробно-резистентни патогени, има суштинска улога во нивниот хроничитет и неуспешен третман. Оваа дисертација е мотивирана од потребата за подлабоко разбирање на микроорганизмите вклучени во хроничните рани, нивната способност за формирање биофилм и нивниот профил на антимикробна резистенција, со цел да се унапреди дијагностиката, третманот и исходот кај овие пациенти. Истражувањето има потенцијал да придонесе кон развој на нови стратегии за таргетирана антимикробна терапија и контрола на биофилмот во клиничка пракса.

3.0 ЦЕЛИ НА СТУДИЈАТА

3.1 Генерална цел:

3.1.1 Да се испитаат микробиолошките агенсии кај хроничните рани, нивниот потенцијал да формираат биофилм и нивната осетливост кон антимикробните средства.

3.2 Специфични цели:

3.2.1 Да се изврши проценка на брзината и степенот на заздравување на хроничните рани кај пациентите со и без изолати на микроорганизам

3.2.2 Да се утврди како влијае присуството и видот на микроорганизмот врз резултатите од лекувањето

3.2.3 Да се изврши проценка на брзината и степенот на заздравување на раните кај пациенти со изолати кои формираат биофилм споредено со пациенти со изолати кои не формираат биофилм

3.2.4 Да се утврди како влијае присуството на биофилмот и степенот на негова продукција врз времето на заздравување на раните

3.2.5 Да се утврди дали биофилм продуцирачките бактерии се поотпорни на антимикробни средства од оние кои не го продуцираат при антимикробна терапија *in vivo*, споредено со резултати од *in vitro* испитување

4.0 МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ

4.1 Место на изведување и дизајн на студијата

Студијата се спроведуваше на Универзитетската клиника за дерматовенерологија во Скопје и Институтот за микробиологија и паразитологија, Медицински факултет-УКИМ во Скопје. Дизајнот на студијата е од тип проспективна студија. Истата беше отпочната после одобрување од Етичката комисија при Медицински факултет на Универзитетот “Св.Кирил и Методиј”-Скопје. Сите испитаници пред вклучување во студијата потпишаа Информирана согласност.

4.2 Примерок на испитаници

Во студијата беа вклучени пациенти кои амбулантски и болнички се лекуваа на Универзитетската клиника за дерматологија во Скопје. Истите беа на возраст над 18 години, од двата пола со хронични рани на долни екстремитети. Студијата се изведуваше до постигнување на релевантен број на вклучени испитаници, а тој број беше 100.

4.3 Критериуми за вклучување во студијата:

- возраст над 18 години, од двата пола
- пациенти со рани на долни екстремитети кои перзистираат повеќе од 4 недели
- пациенти со рани поголеми од 1cm²
- пациенти со потпишана согласност за вклучување во испитувањето

4.4 Критериуми за исклучување од студијата:

- хронични рани предизвикани од малигни тумори, инфламаторни дерматози
- пациенти со изгореници
- пациенти кои се на терапија со перорален антибиотик во последните 7 дена
- пациенти кои се со локална антибиотска терапија за раната во последните 7 дена
- пациенти со кои нема можност за комуникација и соработка

- пациенти кои не дадоа согласност за учество во студијата
- пациенти со акутна флеботромбоза или длабока венска тромбоза на долните екстремитети
- пациенти со акутна инфекција на меките ткива(целулитис, еризипел)

4.5 Поделба во групи

Испитувана група-пациентите кај кои беше изолиран барем еден патоген микроорганизам, контролна група-пациентите кај кои немаше изолиран патоген микроорганизам. Соодносот на групите во однос на број на испитаници пред почеток на студијата се дефинираше да биде биде најмалку 70 со 30, оптимално 50 со 50. Постигнавме сооднос 67 пациенти во испитувана група, со 33 пациенти во контролна група.

4.6 Методологија

Кај секој пациент беше земена комплетна анамнеза, дерматолошки статус и медицинска документација за присутна хронична рана на долните екстремитети. За секој пациент се пополни прашалник за базични карактеристики: пол,возраст, националност, професија/хоби, навики, коморбидитети со хронична терапија за истите,социјален аспект (Анекс 1), прашалник за податоци поврзани за раните: време на појавување, дали е третирана или не, ако е третирана со која локална и перорална терапија, димензии на раната, локализација, дали има знаци за инфламација и изглед на околина (Анекс 2). Евалуација на улкусните промени или хроничните рани вклучуваше следење на димензии, површина и локализација на раната. Сите рани беа дигитално фотографирани, а површината на истите се пресметуваше со: SketchAndCalc. Elliott M Dobbs, 2011.Web.<2020>[230]. Кај сите пациенти се направи доплер на долни екстремитети за да се исклучи акутен тромботски процес. Нареден чекор беше земање примерок од самата рана за понатамошно микробиолошко иследување за изолирање и идентификација на соеви на микроорганизми како и идентификација на биофилм. Овој примерок се земаше со помош на микробиолошки брис. Третманот кај сите пациенти беше според протоколот за стандардна нега на рани. Во процесот на заздравување на

рана која е дијагностицирана како хронична, во предвид се земаше проценка поврзана со времето. Доколку во текот на 4 недели стандардна нега, површината на раната е намалена за 50%, најверојатно ќе дојде до зараснување со истиот третман за 12 недели и таквиот третман беше дефиниран како успешен[231]. Доколку дојде до намалување за помалку од 50%, малку е веројатно дека ќе зазdrави со овој третман и неопходна е промена на третман и повторна проценка, и овој третман се дефинираше како неуспешен. Исто така во лекувањето, односно изборот на лекот се користеа и податоците од осетливоста на микроорганизмите кон антимикробните средства. После завршување на терапија со антибиотик се земаше контролен микробиолошки брис. Пациентите се јавуваа на редовни прегледи еднаш неделно во тек на еден месец согласно горе опишаниот протокол за третман на рана.

4.7 Микробиолошки методи

4.7.1 Изолација и идентификација на соевите

Од сите примероци земени од хронични рани се правеше микроскопски препарат по грам како ориентација за состојбата на хроничната рана, во смисла на присуство на бактерии, Грам + или Грам -, квасници, како и присуство или отсуство на леукоцити. Примероците од хронични рани беа култивирани на стандардни микробиолошки хранителни подлоги (Columbia agar за аеробни и факултативно анаеробни бактерии, Schedler agar за анаеробни бактерии, Saburo agar за квасници и мувли и гликозен бујон). Засадените подлоги се инкубираа од 24 до 48 часа за детекција на аеробни и факултативно анаеробни бактерии, 48 часа за анаеробни бактерии во анаеробни лонци со методата на Gas Pack систем, и до 7 дена за детекција на квасници и мувли [232]. По инкубацијата, по потреба се правеше микроскопски препарат по Грам и стандардни биохемиски тестови за конечна идентификација на микроорганизмот. При необични карактеристики на пораснатите микроорганизми, особено кога се работи за инертни бактерии, анаеробни бактерии и габи за идентификација се користеше дополнително и автоматизиран систем со апаратот VITEK 2[232].

4.7.2 Испитување на осетливоста на изолатите

а) Стандарден диск дифузионен метод

Се користеше хранителна комерцијална подлога Muller Hinton агар, освен за стрептококи и анаеробни бактерии, за кои се користеше крвен агар. На засадената хранителна подлога со помош на диспензер се аплицираа антибиотски дискови, подлогите се оставаа 30 минути на собна температура и потоа се инкубираа 24 часа во аеробна атмосфера за аеробни и факултативно анаеробни бактерии, 24 часа во микроаерофилни услови за стрептококи и 48 часа во анаеробни услови за анаеробни бактерии. Осетливоста се одредуваше со мерење на пречникот на зоната на инхибиција на растот околу секој поединечен диск. Бактериите, во зависност од видот на изолатот се тестираа на 10 до 21 антибиотици, и тоа (концентрација во микрограми): амоксицилин (10), пиперацилин- тазобактам (30/6), имипенем (10), меропенем (10), ертапенем (10), амоксицилин-клавуланска киселина (20/10), цефуроксим (30), цефтриаксон (30), цефтазидим (30), цефепим (30), ципрофлоксацин (5), флуклоксацилин (5), котримоксазол (1.25/23.75), амикацин (30), гентамицин (10), клиндамицин (2), еритромицин (15), ванкомицин (5 или одредување на минимална инхибиторна концентрација –МИК), колиситин (МИК), линезолид (10)[233].

б) Автоматизиран систем за одредување на осетливоста – VITEK 2 compact system (bioMérieux), Франција.

Се одредуваа автоматски МИК за скоро истите погоре споменати антибиотици и дополнително. Овој систем во студијата се користеше во оние случаи опишани погоре, кога се користи за идентификација, па во пакет се користеше и за одредување на осетливоста.

Интерпретација на резултатите, независно од методот беше во S осетлив, I – интермедиерен и R – резистентен, со користење на референтни гранични вредности (breakpoints) според меѓународниот EUCAST систем[233].

4.7.3 Чување на соевите

По идентификацијата, селектираните соеви се нумерираа, за секој нумериран сој се водеше документација, со податоци за потеклото на сојот (име и презиме на пациентот, лабораториски број, времето кога е изолиран). Од секој нумериран сој

се избра по една колонија за инокулација во 10 ml Триптиказа соја бујон (ТСБ). После тоа се култивираше 18 часа на температура од 37°C. Нареден чекор беше дваесет микролитри од оваа бактериска култура да се супкултивираат на тврд хранителен медиум со цел да се добие бактериски раст од кој една колонија се засадуваше за чување (на 4°C) на Триптиказа соја солен кос агар. Овие резерви се користеа како извор за инокулум за време на експериментот. Остатокот од течната бактериска култура беше употребен за да се сочува сојот во замрзната состојба во 5 примероци (ТСБ суплементиран со 30% раствор на стерилен глицерол на $t = -80^{\circ}\text{C}$) со цел да се избегне повеќекратна супкултивација и последователна генетска модификација на оригиналниот изолат. Како контрола при изведување на микродилуцискиот метод и методите за култивирање на биофилм беше употребен соодветен интернационален референтен сој предложен за контрола на квалитет од Националниот комитет за клиничко лабораториско стандардизирање (англ. National Clinical Laboratory Standard Institute-NCLSI).

4.8 Утврдување на способност за создавање биофилм

На сите селектирани соеви се направи скрининг за слуз продуцирачки соеви со метод на адхеренција во стаклена епрувета и боене со сафранин. Прв чекор беше во боросиликатни стаклени епрувети кои содржат мозочен бујон да се направи суспензија од соевите кои треба да се испитаат. Во наредениот чекор, епруветите се инкубираа 48 часа, во аеробни услови, на температура од 35°C. Потоа, супернатантот се одливаше а стаклените епрувети се пребојуваа со 0.1% раствор на сафранин, се премиваа со дестилирана вода три пати и се сушеа. За позитивен резултат се сметаше појава на слој од пребоен материјал на внатрешниот сид од епруветата. Резултатот беше негативен кога обоен прстен се појавуваше на местото на допирната површина течност-воздух.

4.8.1 Култивирање на биофилмот и одредување на неговата маса

Соевите кои при скринингот се дефинираа како “слуз-продуцирачки” понатаму беа обработени според:

1. “Tissue culture plate method (TCP)”-метод за детекција на биофилмот преку култивирање на микроорганизмите во микротитрациски плочки со 96 бунарчиња;

2. Спектрофотометриски семи-квантитативен метод-метод кој служи за одредување на количината на создаден биофилм преку мерење на апсорпцијата на кристал виолет, катјонска боја која врз основа на јонски интеракции се врзува за негативно наелектризираните компоненти на биофилмот[234].

4.8.2 “Tissue culture plate method (TCP)”

За култивирање на биофилмот се користеше модификација на TCP методот поставен од Chirstensen et al [235]. При изведување на овој метод една колонија од претходно спомнатиот Триптиказа соја солен агар се култивираше во 5 ml ТСБ, 18 часа на температура од 37°C. Потоа, суспензија од бактериската култура во стационарна фаза на раст се разредуваше со соодветен медиум во сооднос од 1:100. Потоа 100 µl од секоја бактериска суспензија се изливаа во бунарчињата на стерилна полистиренска микротитрациска плочка со рамно дно. За да се добие средна вредност од секој сој се ставаше по три примероци (во три бунарчиња). Претпоследното односно последното бунарче од редот содржеше хранителен медиум со соодветен референтен сој (позитивна контрола) односно само медиум (негативна контрола). Микротитрациските плочки се инкубираа 24 часа на температура од 37°C без мешање, со цел да се создаде биофилмот. По инкубацијата, со пипетор внимателно се отстрануваше супернатантот а бунарчињата три пати се промиваа со 200µl 85% NaCl со цел да се одстранат планктонските микроорганизми.

4.8.3 Спектрофотометриски семи-квантитативен метод

Масата на биофилмот се одредуваше со мерење на апсорпцијата на кристал виолет [29]. По отстранување на планктонските микроорганизми, бунарчињата темелно се сушеа (30 минути на 60°C); биофилмот создаден во нив се фискираше со 2% натриум ацетат а потоа во секое бунарче се додаваше 0.1% раствор на кристал виолет (120 µl) кој требаше да одстои 10-15 минути на собна температура. Потоа вишокот на боја се отстрануваше со плакнење со дејонизирана вода, а врзаната боја се раствараше со додавање на 120µl 75% етанол. Апсорпцијата на бојата се мереше спектрофотометриски на ELISA читач (OD=570 nm). Оптичката густина (англ. Optical Density-OD) на секој сој и за негативната контрола се

пресметуваше како аритметичка средина од апсорпцијата на трите бунарчиња. Оваа вредност се споредуваше со средната апсорпција на бунарчињата со негативна контрола. Степенот на апсорпција е пропорционален со количината на присутен биофилм. Потоа се утврдуваше “cut-off” вредност (OD_c) која се дефинираше како три стандардни девијации (SD) над OD на негативната контрола: OD_c = средна OD на негативната контрола + (3 × SD од негативната контрола). Интерпретација на резултатите за продукцијата на биофилм беше на следниот начин: отсуство на создавање на биофилм (OD_{coj} < OD_c), слабо создавање биофилм (OD_c < OD_{coj} < 2 × OD_c), умерено создавање биофилм (2 × OD_c < OD_{coj} < 4 × OD_c) и силно создавање на биофилм (4 × OD_c < OD_{coj}) [236].

4.9 Статистичка анализа

Статистичката анализа на податоците беше направена во статистичкиот пакет SPSS for windows 25,0. За тестирање на нормалноста на податоците беа користени Kolmogor-ov-Smirnov и Shapiro-Wilk’s W тест. Категориските (атрибутивни) варијабли се прикажани со апсолутни и релативни броеви, нумеричките (квантитативни) варијабли со просек, стандардна девијација, минимални и максимални вредности, медијална вредност и интерквартилен ранк. За компарирање на квалитативните податоци се користеа непараметарски тестови за независни примероци (Chi-square test, Fisher exact test). Квантитативните варијабли беа споредувани Mann-Whitney U test и Kruskal-Wallis ANOVA test, при споредување на две односно три групи соодветно. Статистичката сигнификантност беше дефинирана на ниво на $p < 0.05$.

5.0 РЕЗУЛТАТИ

5.1 Основни карактеристики на пациентите и на хроничните рани

Во истражувањето беа вклучени 100 испитаници, пациенти на Универзитетската клиника за дерматовенерологија, лекувани амбулантски и болнички од хронични рани на долните екстремитети. Половата структура на пациентите ја сочинуваа 51% машки пациенти и 49% пациенти од женски род.

Пациентите беа на возраст од 30 до 92 години, со просечна возраст од 63.9 ± 15.1 година. Во структурата по националност 82% беа Македонци, 89% пациенти беа во брак. Активни пушачи беа 35%, позитивна историја за хронични заболувања имаа 90% пациенти, и тоа 59% беа со хипертензија, 26% со хиперлипидемија и 23% со дијабетес мелитус (табела 1).

Табела 1. Дескриптивна статистика на основни карактеристики на пациентите

варијабла	n (%)
пол	
машки	51 (51)
женски	49 (49)
возраст (mean $\pm$ SD)(min- max)	(63.9 $\pm$ 15.2) (30 – 92)
националност	
Македонец	39 (39)
Македонка	43 (43)
Албанец	8 (8)
Албанка	2 (2)
Србин	2 (2)
Србинка	2 (2)
Ром	1 (1)
Ромка	1 (1)
Влав	1 (1)
Босанка	1 (1)
пушач	35 (35)
фамилијарен статус	
фамилија	89 (89)
сам	11 (11)
коморбидитети	90 (90)

Вкупно беа анализирани 106 рани, пациентите најчесто имаа 1 рана што беше од наш интерес (95%). Просечното траење на раните беше 11.10 ± 7.6 недели, најкраткото времетраење на раните беше 4 недели, најдолгото 48 недели. Кај 50%

од пациентите времетраењето на раните беше пократко од 8 недели (median=8 недели)(табела 2). Пациентите не примаа антибиотик пер ос и локално во последните 7 дена.

Просечната површина на раните пред почеток на третман беше $7.87 \pm 6.1 \text{ cm}^2$, во наредните 4 недели по почеток на третманот беше измерена просечна површина од 6.96 ± 5.9 , 6.14 ± 5.4 , 5.37 ± 5.1 и $4.79 \pm 4.8 \text{ cm}^2$,соодветно првата, втората, третата и четвртата недела(табела 2).

Воспалителни симптоми беа регистрирани кај 80% пациенти,оток кај 14%, црвенило кај 54%, болка кај 50% и секреција од раната кај 2% пациенти(табела 2).

Табела 2. Основни карактеристики на хроничните рани кај испитаниците

варијабла	n (%)
број на рани	
1	95 (95)
2	4 (4)
3	1(1)
време на појава / траење на рана (недели) (mean $\pm$ SD)(min- max) median (IQR)	(11.10 $\pm$ 7.6) (4 – 48) 8(6 – 13)
дали е третирана раната претходно	
да	74(74)
дали примал атибиотик пер ос во последните 7 дена	
не	100 (100)
дали примал атибиотик локално на рана во последните 7 дена	
не	100 (100)
рана 1 површина/cm^2 (mean $\pm$ SD)	
0 недела	7.87 ± 6.1
1 недела	6.96 ± 5.9
2 недела	6.14 ± 5.4
3 недела	5.37 ± 5.1
4 недела	4.79 ± 4.8
Локализација	
Потколеница	67
Малеолус	24
Стопало	15
Знаци на воспаление	80 (80)
оток	14 (14)
црвенило	54 (54)
болка	50 (50)
секрет	2 (2)

Од клиничките знаци за биофилм најчесто беше регистрирано продолжено здравување - (86%) пациенти, и кај исто толкав процент на пациенти имаше промени во околината на раната, најчесто хиперпигментација (56%)(табела 3).

Табела 3. Клинички знаци за биофилм

варијабла	n (%)
клинички знаци за биофилм	
продолжено здравување	86 (86)
антибиотик без подобрување, продолжено здравување	1 (1)
повторувачки инфекции, продолжено здравување	7 (7)
претходен третман со аб без подобрување, повторувачки инфекции, продолжено здравување на рана	2 (2)
повторувачки инфекции,продолжено здравување,претходен третман со аб без подобрување	4 (4)
промени во околина на рани	
еритем	86 (86)
хиперпигментација	61 (61)
губиток на влакна	56 (56)
екзематизација	2 (2)
	19 (19)

5.2 Микробиологија на рани

Од вкупно 100 испитаници во студијата, 33(33%) беа со негативен микробиолошки брис. Кај 67(67%) пациенти од раната беа изолирани патогени микроорганизми (график 1).

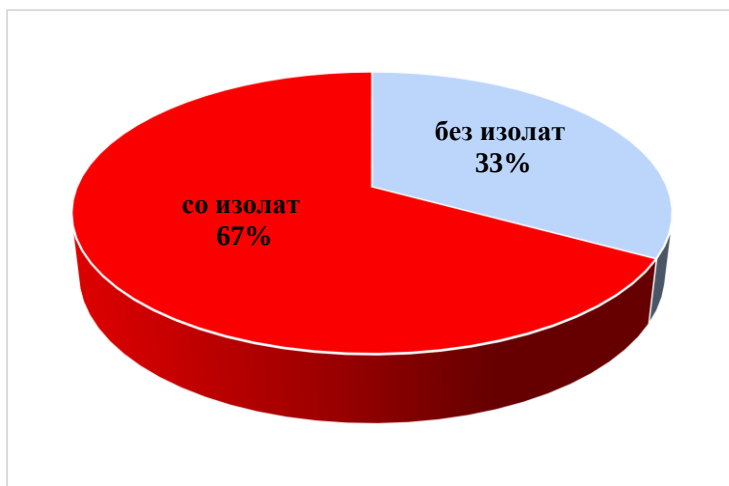


График 1.Присуство на изолат во рана

Од анализираните хронични рани во оваа студија изолирани беа бактериите прикажани во табела 4 и 5. Колонизацијата на раните најчесто беше со *MSSA*(methicillin sensitive *Staphylococcus aureus*) (35.82%), *Pseudomonas aeruginosa* (19.4%), *Enterobacter* (19.4%) , и *Escherichia coli* (17.91%). Од сите изолати во групата на грам(+) припаѓаа 40.21%, а грам(-) беа 59.79%. Полимикробност, односно присуство на повеќе од еден изолат покажаа 20/67(29.85%) рани. Најчеста комбинација на изолати беше по 2/20(10%) од *MSSA* и *Pseudomonas aeruginosa*, *MSSA* и *Enterobacter*.

Табела 4. Застапеност на поедини соеви во изолат од прв брис

Изолат(прв брис)	Застапеност на поедини соеви во изолат од прв брис			
	Count	Cumulative Count	Percent	Cumulative Percent
<i>MRSA</i>	2	2	2,98507	2,9851
<i>Escherichia coli</i>	4	6	5,97015	8,9552
<i>MSSA</i>	1	7	1,49254	10,4478
<i>Proteus mirabilis, Enterococcus</i>	2	9	2,98507	13,4328
<i>MSSA</i>	16	25	23,88060	37,3134
<i>Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli ESBL +</i>	1	26	1,49254	38,8060
<i>Pseudomonas aeruginosa, Enterobacter species, MSSA</i>	1	27	1,49254	40,2985
<i>Candida albicans, Acinetobacter, Enterococcus</i>	1	28	1,49254	41,7910
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7	35	10,44776	52,2388
<i>MRSA, Escherichia coli</i>	1	36	1,49254	53,7313
<i>Enterobacter species</i>	10	46	14,92537	68,6567
<i>Proteus vulgaris</i>	1	47	1,49254	70,1493
<i>MRSA</i>	1	48	1,49254	71,6418
<i>MSSA, MRSA</i>	1	49	1,49254	73,1343
<i>Streptococcus beta haemolyticus</i>	1	50	1,49254	74,6269
<i>Escherichia coli, Enterobacter species, Enterobacter aerogenes, MSSA, Enterococcus</i>	1	51	1,49254	76,1194
<i>MSSA, Proteus vulgaris, Pseudomonas aeruginosa</i>	1	52	1,49254	77,6119
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1	53	1,49254	79,1045
<i>Candida species</i>	1	54	1,49254	80,5970
<i>Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa</i>	1	55	1,49254	82,0896
<i>Escherichia coli, Streptococcus agalactiae grupa B</i>	1	56	1,49254	83,5821
<i>Proteus mirabilis, Pseudomonas aeruginosa</i>	2	58	2,98507	86,5672
<i>Corynebacterium gr. JK</i>	2	60	2,98507	89,5522
<i>Corynebacterium gr. JK, Serratia species</i>	1	61	1,49254	91,0448

<i>Serratia species, Stenotrophomonas maltophilia</i>	1	62	1,49254	92,5373
<i>Enterobacter species; Stenotrophomonas maltophilia</i>	1	63	1,49254	94,0299
<i>Serratia species, nediferencirani Gr(-) bacili, Achromobacter</i>	1	64	1,49254	95,5224
<i>Serratia species</i>	1	65	1,49254	97,0149
<i>Escherichia coli</i> ESBL (+), <i>Enterococcus</i>	1	66	1,49254	98,5075
<i>Escherichia coli</i> ESBL (+)	1	67	1,49254	100,0000

Табела 5 Процентуална застапеност на изолати од прв брис

варијабла (изолати)	n (%)
<i>MSSA</i>	24 (35.82)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13 (19.4)
<i>Enterobacter</i>	13 (19.4)
<i>Escherichia coli</i>	12 (17.91)
<i>Enterococcus</i>	7 (10.45)
<i>Proteus mirabilis</i>	5 (7.46)
<i>MRSA</i>	5 (7.46)
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	4 (5.97)
<i>Serratia</i>	4 (5.97)
<i>Corynebacterium gr. JK</i>	3 (4.48)
<i>Proteus vulgaris</i>	2 (2.98)
<i>Candida spp</i>	2 (2.98)
<i>Acinetobacter</i>	1 (1.49)
Недиференцирани грам(-) бацили	1 (1.49)
<i>Achromobacter denitrificans</i>	1 (1.49)

На график 2 претставена е процентуалната застапеност на поедините специеси изолирани од хроничните рани.

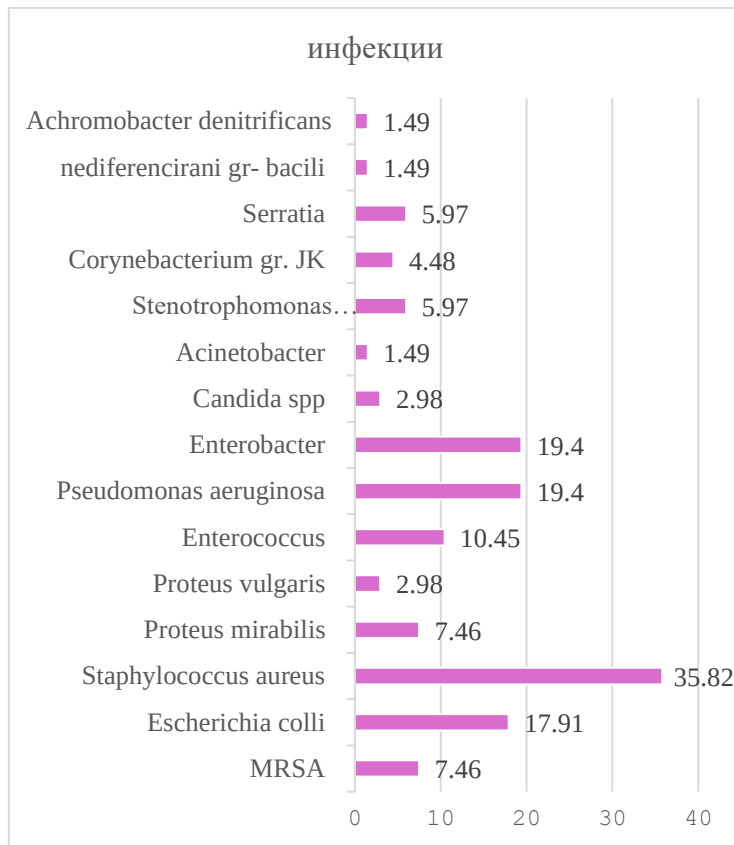


График 2.Процентуална застапеност на бактериски специеси изолирани од хроничните рани

5.2.1 Клинички карактеристики на раните со/без присуство на изолат и клинички знаци за биофилм

Знаци за воспаление беа регистрирани почесто кај пациентите со изолат на микроорганизми во споредба со пациентите без изолат – 57(85.07%) vs 23 (69.7%), но разликата не беше доволна да се потврди и статистички како сигнификантна ($p=0.071$) (табела 6).

Табела 6. Знаци за воспаление кај раните

Знаци за воспаление	групи			p-level
	n (%)	без изолати n (%)	со изолати n (%)	
да	80 (80)	23 (69.7)	57 (85.07)	$X^2=3.27$ $p=0.071$
не	20 (20)	10 (30.30)	10 (14.93)	
вкупно	100	33	67	

Pearson Chi-square

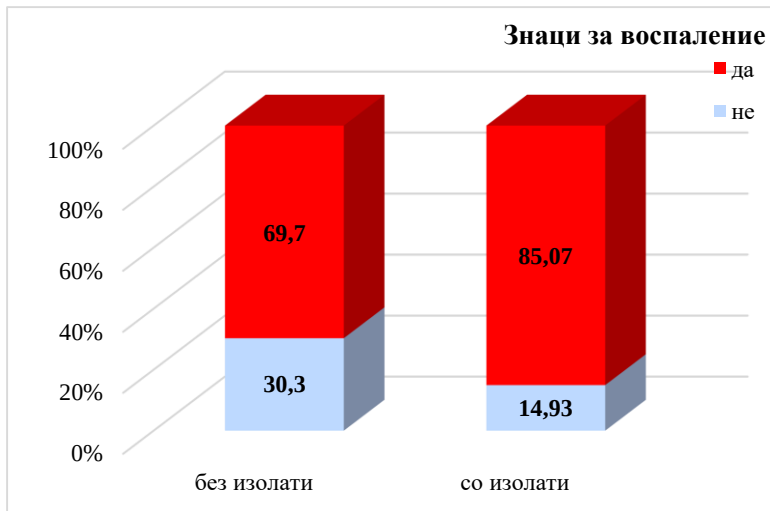


График 3. Графички приказ на присуство на знаци на воспаление кај рани со и без изолат

Споредбата на групите пациенти со/без изолат на микроорганизми во однос на воспалителните знаци презентираше незначајно почест наод на оток кај пациентите со позитивен изолат – 11 (16.42%) vs 3 (9.09%), $p=0.377$; сигнификантно почесто црвенило кај пациентите со позитивен изолат – 45 (67.16%) vs 9 (27.27%), $p=0.00017$; болка слично беше застапена кај пациентите со/без изолат – 34 (50.75%) vs 16 (48.48%), $p=0.83$; секрет од рана кај 2 (2.99%) пациенти со позитивен изолат (табела 6а).

Табела 6а. Знаци за воспаление кај раните

варијабла	групи			p-level
	n (%)	без изолати n (%)	со изолати n (%)	
оток				
да	14 (14)	3 (9.09)	11 (16.42)	p=0.377
не	86 (86)	30 (90.91)	56 (83.58)	
вкупно	100	33	67	
црвенило				
да	54 (54)	9 (27.27)	45 (67.16)	X ² =14.16 ***p=0.00017
не	46 (46)	24 (72.73)	22 (32.84)	
вкупно	100	33	67	
болка				
да	50 (50)	16 (48.48)	34 (50.75)	X ² =0.045 p=0.83
не	50 (50)	17 (51.52)	33 (49.25)	
вкупно	100	33	67	
секрет				
да	2 (2)	0	2 (2.99)	p=1.0
не	98 (98)	33 (100)	65 (97.01)	
вкупно	100	33	67	

Pearson Chi-square – two tailed, Pearson Chi-square

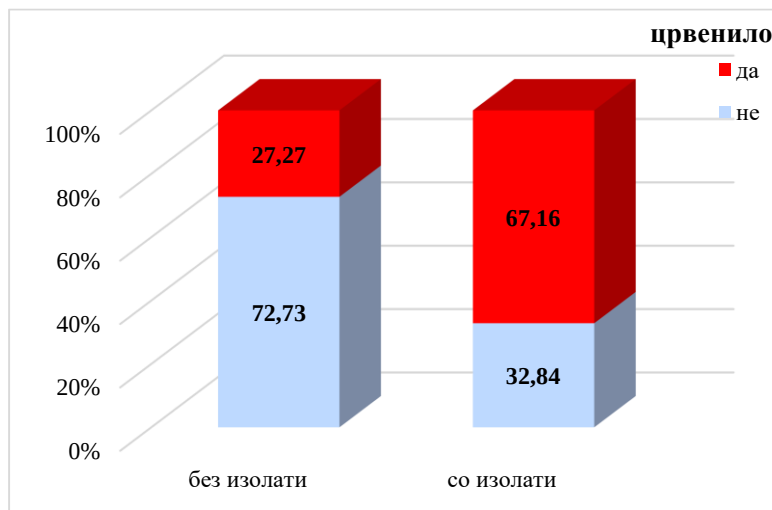


График 4. Процентуална застапеност на црвенилото како знак на воспаление во групата со и без изолат

Во тек на студијата се следеа клиничките знаци за присуство на биофилм. Резултатите покажаа дека претходен третман со антибиотик без подобрување имаа само пациентите со изолат на микроорганизми – 7(10.45%). Немаше пациенти со прекумерна ексудација од рана, сите пациенти имаа продолжено заздравување, повторувачки инфекции имаа почесто пациентите со позитивен изолат – 12 (17.91%) vs 1 (3.03%), разликата статистички беше на граница на сигнификантност ($p=0.055$). (табела 7)

Табела 7. Присуство на клинички знаци за биофилм

варијабла	групи			p-level
	n (%)	без изолати n (%)	со изолати n (%)	
претходен третман со антибиотик без подобрување				
да	7 (7)	0	7 (10.45)	p=0.092
не	93 (93)	33 (100)	60 (89.55)	
вкупно	100	33	67	
повторувачки инфекции				
да	13 (13)	1 (3.03)	12 (17.91)	p=0.055
не	87 (87)	32 (96.97)	55 (82.09)	
вкупно	100	33	67	

Pearson Chi-square – two tailed

Промени во околината на раната сигнификантно почесто се среќаваа кај пациентите со изолирани микроорганизми – 62 (92.54%) vs 24 (72.73%), $p=0.0073$; еритем

сигнификантно почесто имаа пациентите со изолат – 51(76.12%) vs 10 (30.3%), $p=0.00001$; застапеноста на хиперпигментација беше слична во групите со и без изолат – 36 (53.73%) vs 20 (60.61%), $p=0.515$; слична беше и застапеноста на губиток на влакна - 1 (1.49%) vs 1 (3.03%), $p=1.0$; екзематизација сигнификантно почесто имаа пациентите со изолат на микроорганизми – 17 (25.37%) vs 2 (6.06%), $p=0.028$ (табела 7).

Табела 7. Присуство на клинички знаци за биофилм

варијабла	групи			p-level
	n (%)	без изолати n (%)	со изолати n (%)	
Промена во околина на рани				
рани	86 (86)	24 (72.73)	62 (92.54)	X ² =7.21 p=0.0073
0	14 (14)	9 (27.27)	5 (7.46)	
вкупно	100	33	67	
Еритем				
да	61	10 (30.3)	51 (76.12)	X ² =19.51 ***p=0.00001
не	39	23 (69.7)	16 (23.88)	
вкупно	100	33	67	
Хиперпигментација				
да	56 (56)	20 (60.61)	36 (53.73)	X ² =0.42 p=0.515
не	44 (44)	13 (39.39)	31 (46.27)	
вкупно	100	33	67	
Губиток на влакна				
да	2 (2)	1 (3.03)	1 (1.49)	p=1.0
не	98 (98)	32 (96.97)	66 (98.51)	
вкупно	100	33	67	
Екзематизација				
да	19 (19)	2 (6.06)	17 (25.37)	*p=0.028
не	81 (81)	31 (93.94)	50 (74.63)	
вкупно	100	33	67	

Pearson Chi-square

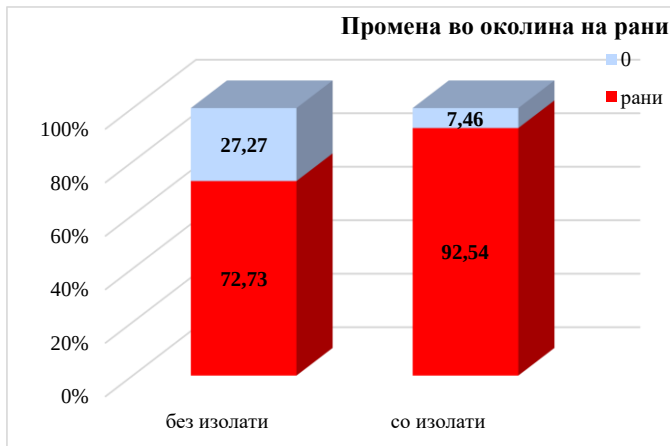


График 5.Процентуална застапеност на промена во околина на рана кај група со и без изолат

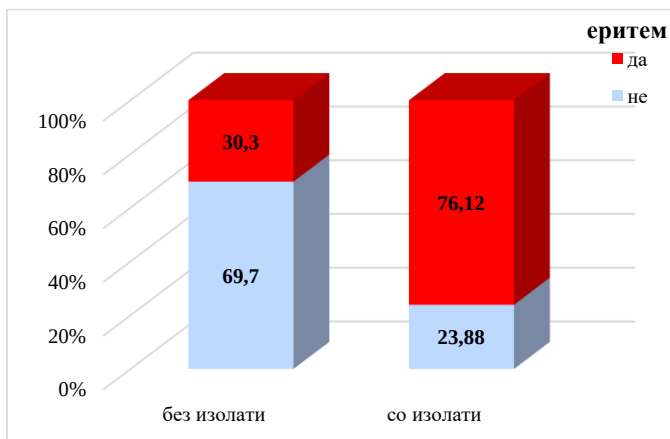


График 5а.Процентуална застапеност на еритем околу рана кај група со и без изолат

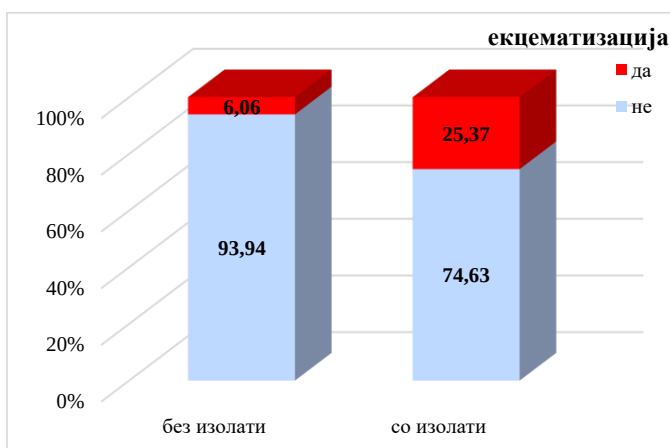


График 5б.Процентуална застапеност на екзематизација околу рана кај група со и без изолат

5.2.2 Класификација на изолатите врз основа на нивниот капацитет за создавање на биофилм

За способноста за создавање на биофилм ин витро беа испитани вкупно 88 соеви изолирани од пациенти со рани. Анализите беа изведени со примена на ТСР методот. При интерпретација на резултатот ја употребивме “cut-off” вредноста (OD_c) пресметана врз основа на добиената оптичка густина на негативните проби (OD_n): **OD_n = 0.1146, 0.1164, 0.1153**

Стандардна девијација (SD) – 0.000907;

“cut-off” вредност (OD_c) дефинирана како три стандардни девијации (SD) над OD на негативната контрола:

OD_c = средна OD на негативната контрола + (3 × SD од негативната контрола)

OD_c = 0.1154 + 3 × 0.000907

OD_c = 0.1154 + 0.0027 = 0.1181

Резултатите за продукцијата на биофилм беа интерпретирани на следниот начин:

отсуство на создавање на биофилм (OD_{coj} < OD_c) (OD_{coj} < 0.1181)

слабо создавање биофилм (OD_c < OD_{coj} < 2 × OD_c) (0.1181 < OD_{coj} < 0.2362),

умерено создавање биофилм (2 × OD_c < OD_{coj} < 4 × OD_c) (0.2362 < OD_{coj} < 0.4724)

силно создавање на биофилм (4 × OD_c < OD_{coj}) (0.4724 < OD_{coj}) [236]

Табела 8. Потенцијал за создавање биофилм кај изолати од прв и контролен брис

Изолати од рани				
изолат	OD 570 nm на изолат од прв брис	Потенцијал за биофилм (прв брис)	OD 570 nm на изолат од контролен брис	Потенцијал за биофилм (контролен брис)
<i>MRSA</i>	0.9563	силен		
<i>Escherichia coli</i>	0.3801	умерен	0.1096	
<i>MSSA</i>	0.1777	слаб	0.1389	слаб
<i>Proteus mirabilis</i>	0.3552	умерен	0.1207	слаб
<i>Enterococcus</i>	0.6313	силен		
<i>MSSA</i>	0.1683	слаб		
<i>MRSA</i>	0.0366	отсуство		
<i>MSSA</i>	0.2736	умерен		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.6442	силен	0.4895	силен

<i>Escherichia coli</i> ESBL +	0.1596	слаб		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.5013	силен		
<i>Enterobacter species</i>	0.1495	слаб		
MSSA	0.5897	силен		
MSSA	0.1831	слаб		
MSSA	0.3973	умерен		
<i>Candida albicans</i>	0.5213	силен	0.4203	силен
<i>Acinetobacter</i>	0.0325	отсуство		
<i>Enterococcus</i>	0.5989	силен	0.3668	умерен
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.6958	силен	0.4558	умерен
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.6103	силен	0.4572	умерен
MSSA	0.7127	силен		
MRSA	0.0324	отсуство		
<i>Escherichia coli</i>	0.1495	слаб		
MSSA	0.1503	слаб		
MSSA	0.0326	отсуство		
MSSA	0.147	слаб		
<i>Enterobacter species</i>	0.6832	силен		
<i>Proteus vulgaris</i>	0.0637	отсуство		
MRSA	0.0998	отсуство		
MSSA	0.0879	отсуство		
MRSA	0.0924	отсуство		
<i>Proteus mirabilis</i>	0.1199	слаб		
<i>Enterococcus</i>	0.1184	слаб		
MSSA	0.4932	силен		
MSSA	0.5001	силен	0.4936	силен
<i>Escherichia coli</i>	0.1155	отсуство		
<i>Enterobacter species</i>	0.2111	слаб	0.137	слаб
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0.2031	слаб		
MSSA	1.300	силен	0.8969	силен
<i>Enterococcus</i>	1.0078	силен	0.4033	силен
<i>Escherichia coli</i>	0.3109	умерен		
MSSA	0.7633	силен	0.6511	силен
<i>Proteus vulgaris</i>	0.0989	отсуство		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1.0024	силен	0.8776	силен
<i>Escherichia coli</i>	0.2164	слаб		

<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0. 0767	отсуство		
<i>Escherichia coli</i>	0. 2055	слаб		
<i>Candida species</i>	1. 0131	силен	0.613	силен
<i>Escherichia coli</i>	0. 2997	умерен	0.0968	отсуство
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1.1125	силен	0.1315	слаб
<i>Escherichia coli</i>	0.1199	умерен		
<i>Proteus mirabilis</i>	0. 4312	умерен		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.0983	отсуство		
MSSA	0. 1143	отсуство		
MSSA	0. 2178	умерен	0.1243	слаб
MSSA	0. 2122	умерен	0.1935	умерен
<i>Corynebacterium gr. JK</i>	1. 0081	силен	0.1211	слаб
<i>Enterobacter species</i>	0. 8868	силен		
<i>Enterobacter species</i>	0. 8778	силен		
<i>Enterobacter species</i>	0. 7538	силен	0.4538	умерен
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0. 1124	отсуство		
<i>Corynebacterium gr. JK</i>	0. 9821	силен		
<i>Serratia species</i>	0. 0299	отсуство		
<i>Corynebacterium gr. JK</i>	0. 8793	силен		
<i>Enterobacter species</i>	0. 6691	силен		
<i>Enterobacter species</i>	0. 8472	силен		
<i>Serratia species</i>	0. 1213	слаб		
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0. 0767	отсуство		
<i>Enterobacter species</i>	0. 3312	умерен		
<i>Enterobacter species</i>	0. 3112	умерен		
<i>Enterobacter species;</i>	0. 1175	отсуство		
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0.7714	силен		
<i>Enterobacter species</i>	0. 3002	умерен		
<i>Serratia species</i>	0. 1135	отсуство		
<i>nediferencirani Gr(-) bacili</i>	0. 4939	силен		

<i>Serratia species</i>	0. 1195	отсуство		
<i>Escherichia coli</i> ESBL (+)	0. 5421	силен	0.3693	умерен
<i>Enterococcus</i>	0. 0969	отсуство		
<i>Proteus mirabilis</i>	0. 2124	слаб		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0. 2372	умерен		
<i>Enterobacter species</i>	0. 5313	силен		
MSSA	0. 1122	отсуство		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0. 6814	силен		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0. 9833	силен		
MSSA	0. 4902	силен		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0. 1967	слаб		
<i>Escherichia coli</i> ESBL (+)	0. 0986	отсуство		
MSSA	0. 5373	силен	0.1029	отсуство
MSSA	0. 6701	силен		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0. 2019	умерен		

Од вкупно анализирани 88 бактериски изолати од прв брис кај пациенти со хронични рани, потенцијал за биофилм покажаа 63 (71,59%).

Во табела 8 и 8а прикажана е дистрибуцијата на изолатите од првиот брис кои создаваат биофилм во однос на интензитетот на потенцијалот за создавање биофилм.

Изолатот на *MRSA* кој создава биофилм беше со силен потенцијал; 3 од 4 изолати на *Escherichia coli* со продукција на биофилм (75%) беа со умерен потенцијал, 1 изолат (25%) беше со силен потенцијал; од 18 изолати на *MSSA* со потенцијал за биофилм, 5(27.78%) имаа слаб потенцијал, 4 (22.22%) имаа умерен потенцијал, 9 (50%) имаа силен потенцијал; 2 (50%) изолати на *Proteus* поединечно од вкупно 4 кои продуцираа биофилм беа со слаб и умерен потенцијал; 1 од 4 изолати на *Enterococcus* со продукција на биофилм (25%) беше со слаб потенцијал, 3(75%) изолати беа со силен потенцијал; од 11 изолати на *Pseudomonas aeruginosa* со потенцијал за биофилм, 1 изолат (9.09%) беше со слаб потенцијал, 2 (18.18%) имаа умерен потенцијал, 8 (72.73%) имаа силен потенцијал; од 12 изолати на *Enterobacter* со потенцијал за биофилм, 3(25%) имаа слаб потенцијал, 3(25%) имаа умерен

потенцијал, 6 (50%) имаа силен потенцијал; 2 изолати на *Candida* со потенцијал за биофилм имаа силен потенцијал, слаб потенцијал имаше изолатот на *Acinetobacter* и на *Achromobacter denitrificans* со продукција на биофилм, изолатот на *Stenotrophomonas maltophilia*, 3 изолати на *Corynebacterium gr. JK* и изолатот на *Недиференцирани Грам(-) бацили* имаа силен потенцијал.

Табела 8а.Потенцијал за создавање биофилм кај изолати од прв брис

варијабла (инфекции) / прв брис	n (%)	потенцијал за биофилм				
		не	да	слаб	умерен	силен
<i>MRSA</i>	5(7.46)	4	1			1(100%)
<i>Escherichia coli</i>	9 (13.43)	5	4		3(75%)	1(25%)
<i>MSSA</i>	22 (32.84)	4	18	5(27.78%)	4(22.22%)	9(50%)
<i>Proteus</i>	6 (8.96)	2	4	2(50%)	2(50%)	
<i>Enterococcus</i>	5(7.46)	1	4	1(25%)		3(75%)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13 (19.4)	2	11	1(9.09%)	2(18.18%)	8(72.73%)
<i>Enterobacter</i>	13 (19.4)	1	12	3(25%)	3(25%)	6(50%)
<i>Candida spp</i>	2 (2.99)		2			2(100%)
<i>Acinetobacter</i>	1 (1.49)		1	1(100%)		
<i>Stenotrophomonas Maltophilia</i>	3 (4.48)	2	1			1(100%)
<i>Corynebacterium gr. JK</i>	3 (4.48)		3			3(100%)
<i>Serratia</i>	4 (5.97)	4				
<i>Недиференцирани Грам(-) бацили</i>	1 (1.49)		1			1(100%)
<i>Achromobacter denitrificans</i>	1 (1.49)		1	1(100%)		

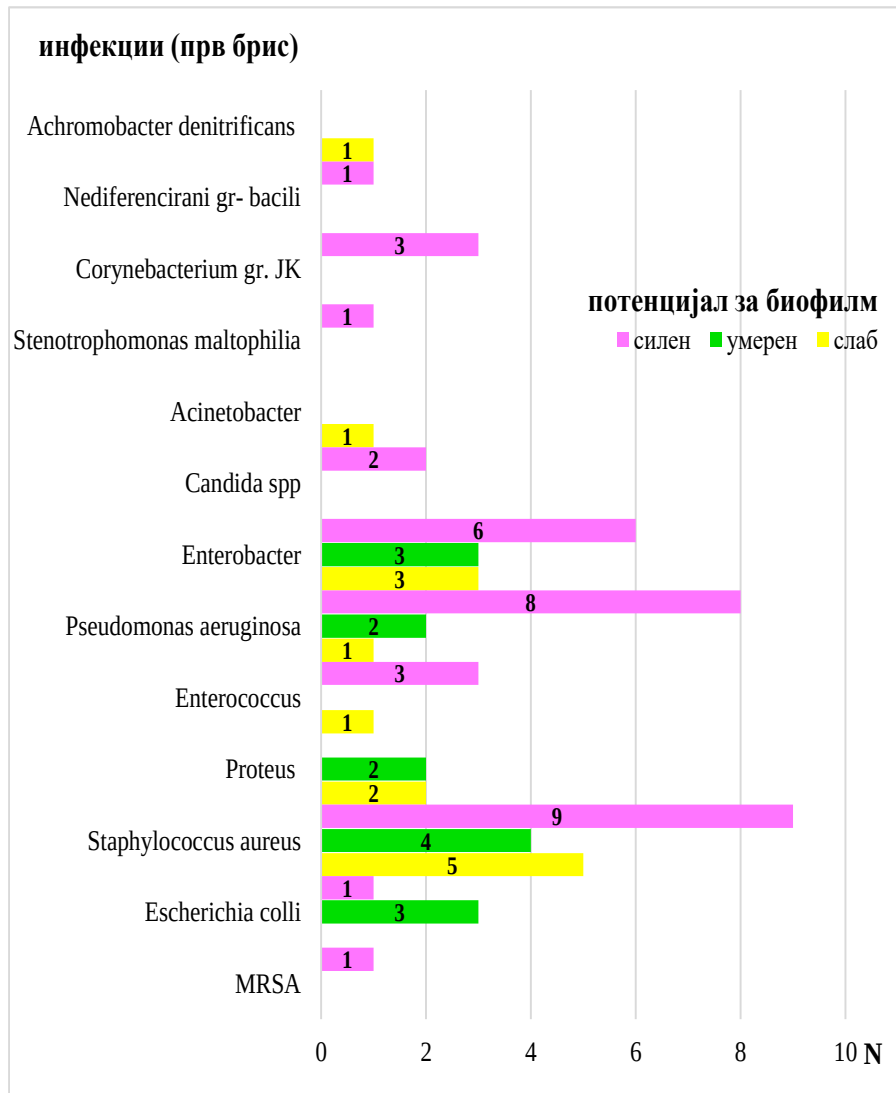


График 6.Потенцијал за создавање биофилм кај изолати од прв брис

Во табела 9, прикажани се резултатите од направените контролни брисеви кај пациентите после спроведен соодветен антибиотски третман. Контролните брисеви беа негативни кај сите изолати на *MRSA*, негативни беа 6/9(66.66%) изолати на *Escherichia coli*, 14/22(63.63%) изолати на *MSSA*, 5/6(83.33%) изолати на *Proteus*, 3/5 (60%) изолати на *Enterococcus*, 8/13 (61.54%) изолати на *Pseudomonas aeruginosa*, 11/13 (69.23%) изолати на *Enterobacter*, 2/3 (66.67%) изолати на *Corynebacterium gr JK*, сите изолати на *Acinetobacter*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Serratia*, *Недиференцирани грам(-) бацили* и *Achromobacter denitrificans*.

Табела 9. Застапеност на поедините специеси во прв и контролен брис од рана

Варијабла / прв брис	Прв брис	Контролен брис	
		позитивен	негативен
<i>MRSA</i>	5		5(100%)
<i>Escherichia coli</i>	9	3(33.33%)	6(66.66%)
<i>MSSA</i>	22	8(36.36%)	14(63.63%)
<i>Proteus</i>	6	1(16.67%)	5(83.33%)
<i>Enterococcus</i>	5	2(40%)	3(60%)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13	5(38.46%)	8(61.54%)
<i>Enterobacter</i>	13	2(30.76%)	11(69.23%)
<i>Candida</i>	2	2(100%)	
<i>Acinetobacter</i>	1		1(100%)
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	3		3(100%)
<i>Corynebacterium gr JK</i>	3	1(33.33%)	2(66.67%)
<i>Serratia</i>	4		4(100%)
Недиференцирани Грам(-) бацили	1		1(100%)
<i>Achromobacter denitrificans</i>	1		1(100%)

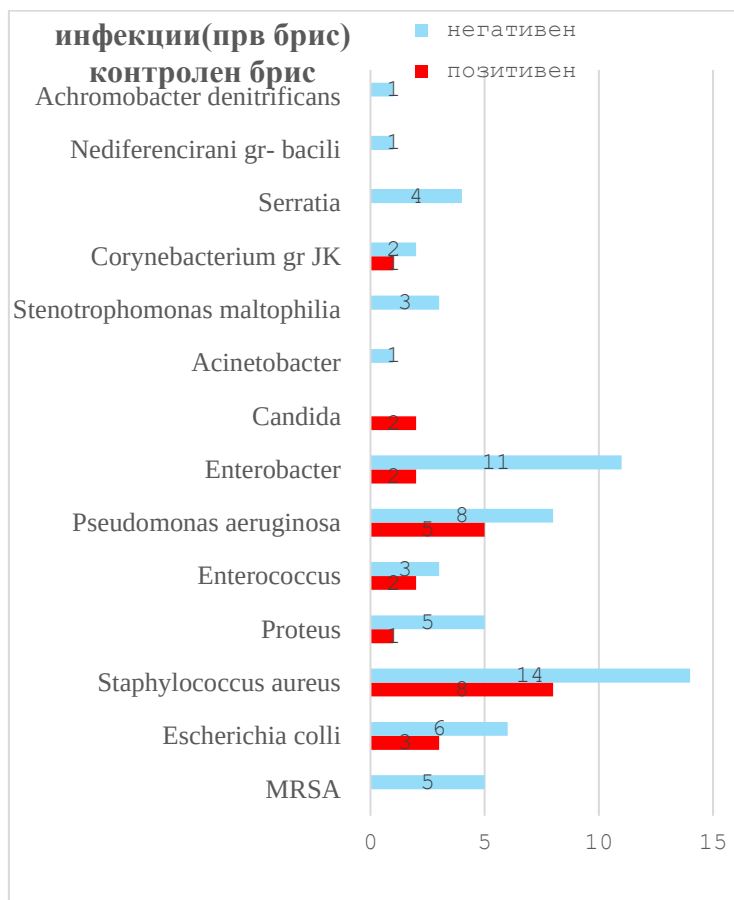


График 7.Графички приказ на соодносот помеѓу негативен и позитивен контролен брис

Во табела 10 прикажана е дистрибуцијата на изолатите од контролниот брис кои создаваат биофилм во однос на интензитетот на потенцијалот за создавање биофилм.

Еден изолат на *Escherichia coli* 1(100%) продуцираше биофилм, при што истиот беше со умерен потенцијал; од 7 изолати на *MSSA* со потенцијал за биофилм, 3(42.85%) имаа слаб потенцијал, 1 (14.28%) умерен потенцијал, 3(42.85%) имаа силен потенцијал;изолатот на *Proteus* со биофилм беше со слаб потенцијал; 1 од 2 изолати на *Enterococcus* со продукција на биофилм (50%) беше со умерен потенцијал, и 1(50%) со силен потенцијал; од 5 изолати на *Pseudomonas aeruginosa* со потенцијал за биофилм, 1 изолат (20%) беше со слаб потенцијал, 2 (40%) имаа умерен потенцијал, 2 (40%) имаа силен потенцијал; од 2 изолати на *Enterobacter* со потенцијал за биофилм, 1(50%) имаше слаб потенцијал, 1(50%) умерен потенцијал; 2 изолати на *Candida* со потенцијал за биофилм имаа силен потенцијал; и изолатот на *Corynebacterium gr. JK* 1(100%) во контролниот брис беше со слаб потенцијал.

Табела 10.Потенцијал за биофилм кај изолати од контролен брис

варијабла (инфекции) / Контролен брис	n (%)	потенцијал за биофилм				
		не	да	слаб	умерен	силен
<i>Escherichia coli</i>	3	2	1		1(100%)	
<i>MSSA</i>	8	1	7	3(42.85%)	1(14.28%)	3(42.85%)
<i>Proteus</i>	1		1	1(100%)		
<i>Enterococcus</i>	2		2		1(50%)	1(50%)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5		5	1(20%)	2(40%)	2(40%)
<i>Enterobacter</i>	2		2	1(50%)	1(50%)	
<i>Candida spp</i>	2		2			2(100%)
<i>Acinetobacter</i>						
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>						
<i>Corynebacterium gr. JK</i>	1		1	1(100%)		
<i>Serratia</i>						
Недиференцирани Грам(-) бацили						
<i>Achromobacter denitrificans</i>						

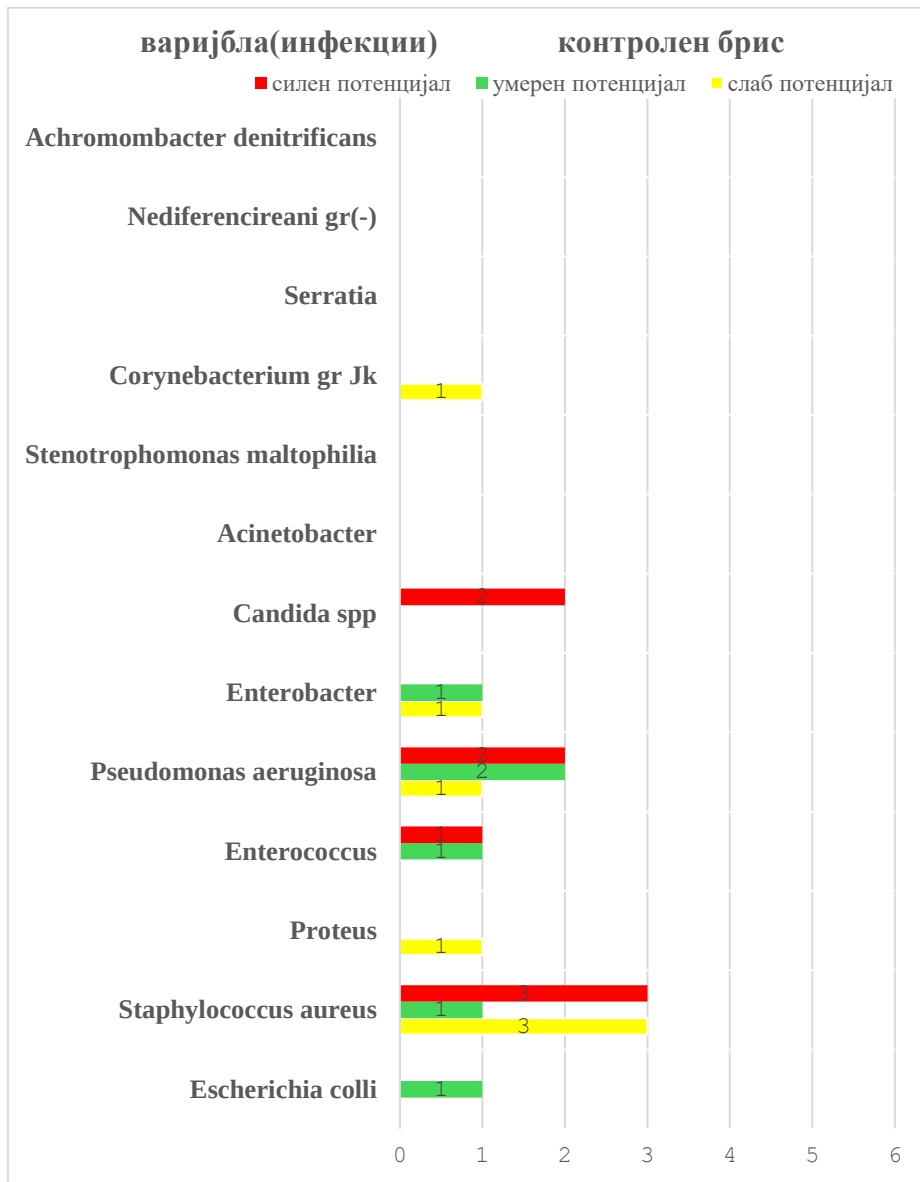


График 8. Потенцијал за создавање биофилм кај изолати од контролен брис

5.3 Брзина и степен на здравување на раните

Согласно добиените резултати, третманот на раната беше успешен кај 38% пациенти. Излекувањето најчесто беше постигнато за 4 недели – 20 пациенти (52.63%)(табела 11).

Табела 11. Процентуална застапеност на успешен и неуспешен третман кај сите испитаници

варијабла	n (%)
третман	
успешен	38 (38)
неуспешен	62 (62)
недела на постигнување успешен третман	
2	4 (4)
3	14 (14)
4	20 (20)

5.3.1 Влијание на присуството на изолат врз заздравувањето на рани

Значајно почесто заздравување на раната имаа пациентите без изолирани микроорганизми, односно, третманот на раната беше успешен кај 27 (81.82%) пациенти без изолат и 11 (16.42%) пациенти со изолат на микроорганизми. Оваа разлика беше статистички сигнификантна ($p < 0.0001$) (табела 12).

Табела 12. Успешност на третманот во групата со и без изолат

варијабла	групи			p-level
	n (%)	без изолати n (%)	со изолати n (%)	
третман				
успешен	38	27 (81.82)	11 (16.42)	X ² =40.14 p=0.000000
неуспешен	62	6 (18.18)	56 (83.58)	
вкупно	100	33	67	

Pearson Chi-square

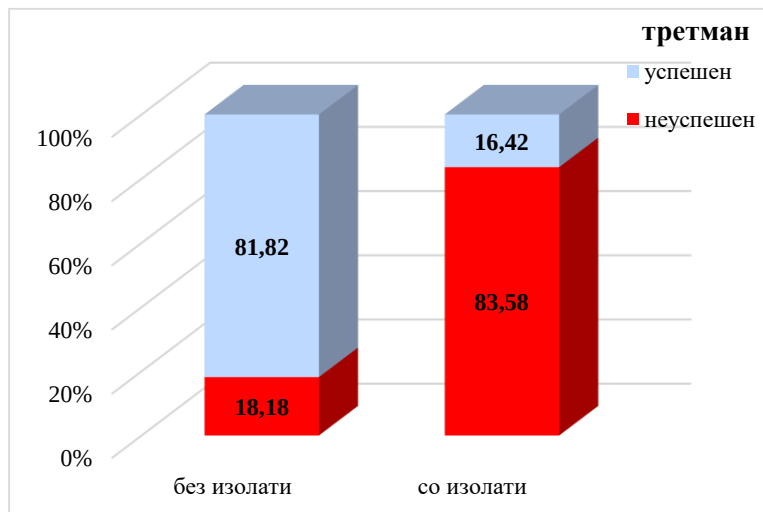


График 9. Процентуална застапеност на успешен и неуспешен третман во групите со и без изолат

Пред почеток на третманот, површините на раните не се разликуваа сигнификантно кај пациентите со и без позитивен изолат ($p=0.088$). Просечната површина на раната изнесуваше 8.87 ± 6.9 и $5.82 \pm 2.9 \text{ cm}^2$, соодветно кај пациентите со и без изолат на микроорганизми, медијаната на површината на раната изнесуваше 6.81 и 5.45 cm^2 , соодветно кај пациентите со и без изолат на микроорганизми (табела 13).

Статистички несигнификантна беше разликата во површината на раната кај пациентите со позитивен и негативен изолат првата и втората недела по почетокот на третманот ($p=0.0925$ и $p=0.074$, соодветно). Една недела по третманот просечната површина на раната изнесуваше $7.95 \pm 6.8 \text{ cm}^2$ во групата со изолат, $4.95 \pm 2.6 \text{ cm}^2$ во групата без изолат на микроорганизми; медијаната на површината на раната изнесуваше 5.92 cm^2 во групата со изолат, 4.63 cm^2 во групата без изолат на микроорганизми. Втората недела од третманот просечната површина на раната изнесуваше $7.11 \pm 6.2 \text{ cm}^2$ во групата со изолат, $4.18 \pm 2.2 \text{ cm}^2$ во групата без изолат на микроорганизми; медијаната на површината на раната изнесуваше 5.53 cm^2 во групата со изолат, 3.83 cm^2 во групата без изолат на микроорганизми (табела 13).

По 3 недели од третманот разликата во површината на раната кај пациентите со позитивен и негативен изолат беше статистички сигнификантна ($p=0.032$). Површината на раната беше сигнификантно поголема кај пациентите со позитивен изолат; (mean 7.11 ± 6.2 vs $4.18 \pm 2.2 \text{ cm}^2$, median 5.53 vs 3.83 cm^2) (табела 13).

И по 4 недели третман, раните кај пациентите со изолат на микроорганизми беа со сигнификантно поголема површина од пациентите без изолат ($p=0.01$). Просечната површина на раната изнесуваше $5.78 \pm 5.5 \text{ cm}^2$ во групата со позитивен изолат, $2.76 \pm 1.5 \text{ cm}^2$ во групата со негативен изолат; медијаната на површината на раната изнесуваше 4.12 cm^2 во групата со позитивен изолат, 2.53 cm^2 во групата со негативен изолат (табела 13).

Табела 13. Анализа со Ман-Витни тест на меѓугрупните разлики во површината на хроничните рани кај испитуваните групи на неделно ниво

групи	статистички параметри – површина (cm ²)				p-level
	n	mean ± SD	min - max	median (IQR)	
0 недела					
без изолати	33	5.82 ± 2.9	1.52 – 12.66	5.45(3.42 – 7.77)	Z=1.71 p=0.088
со изолати	67	8.87 ± 6.9	1.22 – 33.54	6.81(3.57 – 11.35)	
1 недела					
без изолати	33	4.95 ± 2.6	1.18 – 10.23	4.63(2.82 – 6.34)	Z=1.68 p=0.092
со изолати	67	7.95 ± 6.8	1.08 – 32.18	5.92(2.72 – 10.04)	
2 недела					
без изолати	33	4.18 ± 2.2	1.05 – 8.77	3.83(2.25 – 5.96)	Z=1.78 p=0.074
со изолати	67	7.11 ± 6.2	0.89 – 29.69	5.53(2.04 – 9.46)	
3 недела					
без изолати	33	3.37 ± 1.8	0.51 – 7.01	3.22(1.69 – 4.51)	Z=2.14 *p=0.032
со изолати	67	6.36 ± 5.9	0.63 – 28.19	4.72(1.89 – 8.24)	
4 недела					
без изолати	33	2.76 ± 1.5	0.45 – 5.87	2.53(1.34 – 3.87)	Z=2.56 *p=0.01
со изолати	67	5.78 ± 5.5	0.24 – 27.55	4.12(1.72 – 7.68)	

Z(Mann-Whitney U Test)

*sig p<0.05

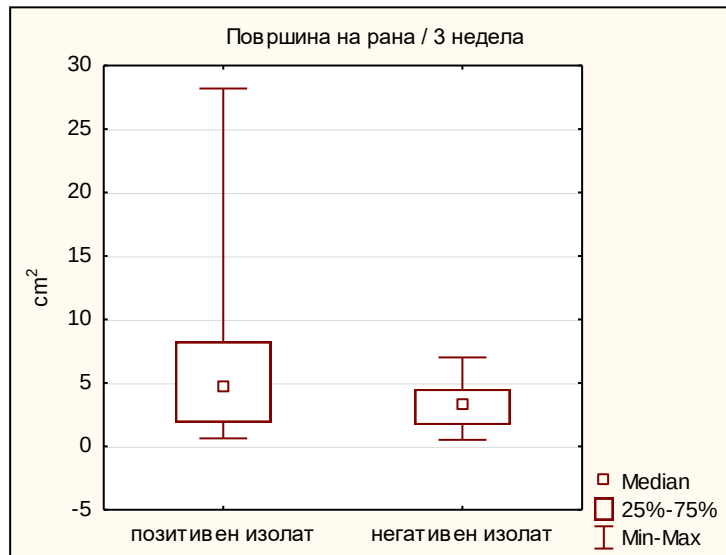


График 10. Графички приказ на дистрибуцијата на резултатите и средните вредности со стандардните девијации на површината на раната кај испитуваните групи во 3-та недела

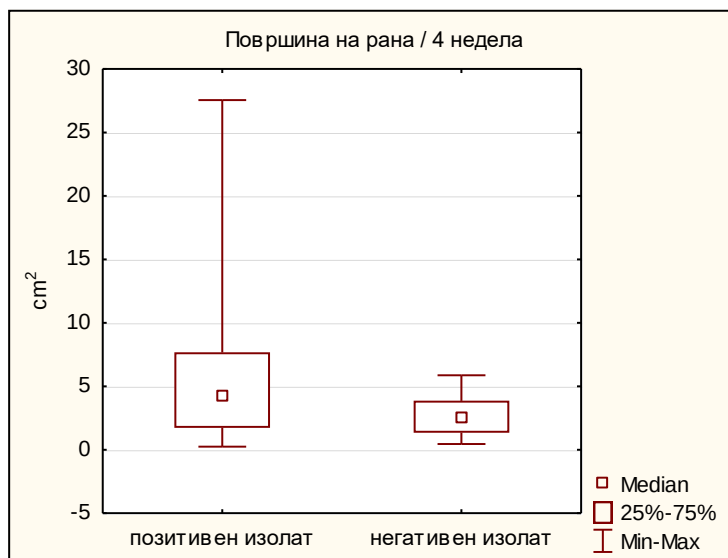


График 10а. Графички приказ на дистрибуцијата на резултатите и средните вредности со стандардните девијации на површината на раната кај испитуваните групи во 4-та недела

5.3.2 Влијание на присуството и видот на микроорганизмите врз заздравувањето

Сите изолирани бактерии, со исклучок на *MSSA* почесто беа регистрирани кај пациентите со неуспешен третман на раната или беа регистрирани само кај пациентите со неуспешен третман: *MRSA* кај 7.14% vs 9.67%, *Escherichia coli* кај 16.074% vs 0%, *Proteus* кај 8.93% vs 9.09%, *Enterococcus* кај 8.93% vs 0%, *Pseudomonas aeruginosa* кај 21.43% vs 9.09%, *Enterobacter* кај 23.21% vs 0%, *Acinetobacter* кај 1.79% vs 0%, *Stenotrophomonas maltophilia* кај 5.36% vs 0%, *Corynebacterium gr* кај 5.36% vs 0%, *Serratia* кај 7.14% vs 0%, недиференцирани грам(-) бацили кај 1.79% vs 0% и *Achromobacter denitrificans* кај 1.79% vs 0% (табела 14).

Согласно резултатите од статистичката анализа, заздравувањето на раната сигнификантно беше асоцирано со инфицирање на раната со *MSSA* ($p=0.0004$), и се должи на значајно почеста колонизација на раните со оваа бактерија со успешен третман (81.82% vs 23.21%) (табела 14).

Табела 14. Дистрибуција на исход од третман по изолирани специеси од прв брис од рана

Варијабла / прв брис	исход од третман			p-level
	n	успешен n (%)	неуспешен n (%)	
<i>MRSA</i>	5	1 (9.67)	4 (7.14)	Fisher'exact p=1.0
<i>Escherichia coli</i>	9	0	9 (16.07)	Fisher'exact p=0.34
<i>MSSA</i>	22	9 (81.82)	13 (23.21)	Fisher'exact ***p=0.0004
<i>Proteus</i>	6	1 (9.09)	5 (8.93)	Fisher'exact p=1.0
<i>Enterococcus</i>	5	0	5 (8.93)	Fisher'exact p=0.58
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13	1 (9.09)	12 (21.43)	Fisher'exact p=0.68
<i>Enterobacter</i>	13	0	13 (23.21)	Fisher'exact p=0.1
<i>Acinetobacter</i>	1	0	1 (1.79)	Fisher'exact p=1.0
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	3	0	3 (5.36)	Fisher'exact p=1.0
<i>Corynebacterium gr JK</i>	3	0	3 (5.36)	Fisher'exact p=1.0
<i>Serratia</i>	4	0	4 (7.14)	Fisher'exact p=1.0
<i>Nediferencirani gr- bacili</i>	1	0	1 (1.79)	Fisher'exact p=1.0
<i>Achromobacter denitrificans</i>	1	0	1 (1.79)	Fisher'exact p=1.0

***sig p<0.0001

На график 11 прикажана е процентуалната застапеност на поедини видови изолати во однос на успешноста на третманот.

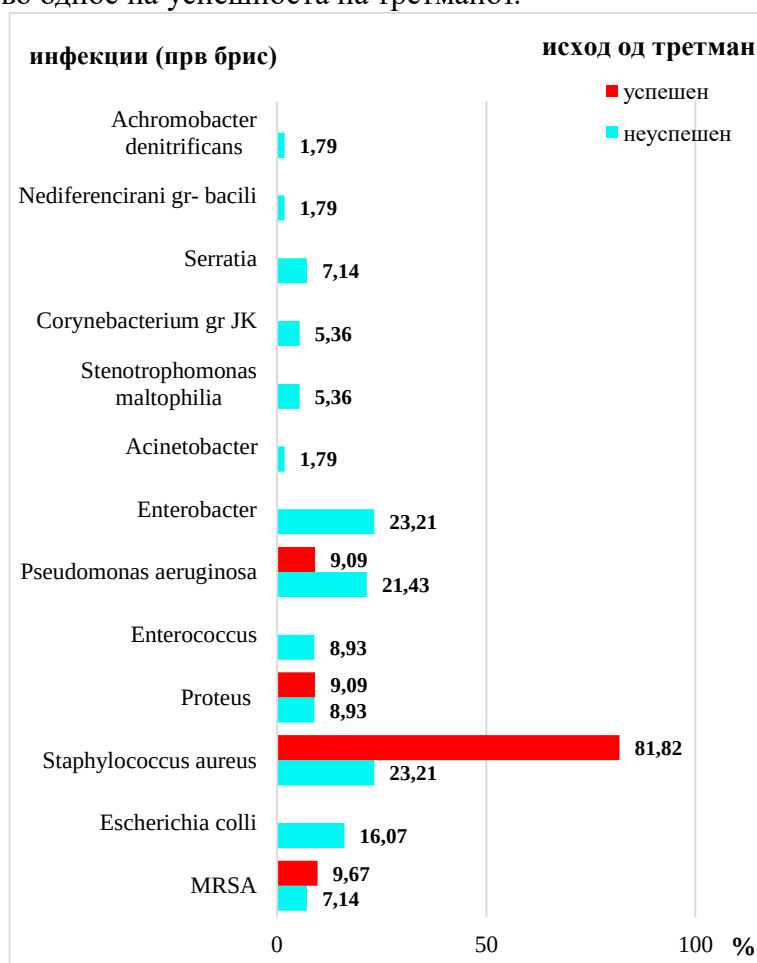


График 11. Графички приказ на процентуална застапеност на поедините специеси во однос на успешноста на третманот

Успешен третман на раната имаа 1/4 пациенти (25%) со изолат на *MRSA* без потенцијал за биофилм, третманот на раната кај пациентот со изолат на *MRSA* со потенцијал беше неуспешен (табела 15).

Табела 15. Приказ на успешност на третманот кај *MRSA*

<i>MRSA</i> прв брис има потенцијал	третман			p-level
	n	успешен n (%)	неуспешен n (%)	
да	1	0	1 (100)	p=1.0
не	4	1 (25)	3 (75)	
вкупно	5	1	4	

Pearson Chi-square – two tailed

Сите изолати на *Escherichia coli*, со/без потенцијал за биофилм беа изолирани кај пациенти со неуспешен третман(табела 16).

Табела 16. Приказ на успешност на третманот кај *Escherichia coli*

<i>Escherichia coli</i> прв брис има потенцијал	третман		
	n	успешен n (%)	неуспешен n (%)
да	7	0	7 (100)
не	2	0	1 (100)
вкупно	9	0	9

Pearson Chi-square – two tailed

Успешен третман на раната имаа 2/4 пациенти (50%) со изолат на *MSSA* без потенцијал за биофилм, и 7/18 пациенти (38.89%) со изолат на *MSSA* со потенцијал. Успешен третман на раната имаа незначајно почесто пациентите со изолат на *MSSA* без потенцијал за биофилм (p=1.0) (табела 17).

Табела 17. Приказ на успешност на третманот кај *MSSA*

<i>MSSA</i> прв брис има потенцијал	третман			p-level
	n	успешен n (%)	неуспешен n (%)	
да	18	7 (38.89)	11 (61.11)	p=1.0
не	4	2 (50)	2 (50)	
вкупно	22	9	13	

Pearson Chi-square – two tailed

Успешен третман на раната имаа 1/4 пациенти (25%) со изолат на *Proteus* со потенцијал за биофилм, третманот на раната кај 2 пациенти со изолат на *Proteus* без потенцијал за создавање биофилм беше неуспешен (табела 18).

Табела 18. Приказ на успешност на третманот кај *Proteus*

<i>Proteus</i> прв брис има потенцијал	третман			p-level
	n	успешен n (%)	неуспешен n (%)	
да	4	1 (25)	3 (75)	p=1.0
не	2	0	2 (100)	
вкупно	6	1	5	

Pearson Chi-square – two tailed

Сите изолати на *Enterococcus*, со/без потенцијал за биофилм беа изолирани кај пациенти со неуспешен третман (табела 19).

Табела 19. Приказ на успешност на третманот кај *Enterococcus*

<i>Enterococcus</i> прв брис има потенцијал	третман		
	n	успешен n (%)	неуспешен n (%)
да	4	0	4 (100)
не	1	0	1 (100)
вкупно	5	0	5

Pearson Chi-square – two tailed

Успешен третман на раната имаа 1/11 пациенти (9.09%) со изолат на *Pseudomonas aeruginosa* со потенцијал за биофилм, третманот на раната кај 2 пациенти со изолат на *Pseudomonas aeruginosa* без потенцијал за создавање биофилм беше неуспешен (табела 20).

Табела 20. Приказ на успешност на третманот кај *Pseudomonas aeruginosa*

<i>Pseudomonas</i> прв брис има потенцијал	третман			p-level
	n	успешен n (%)	неуспешен n (%)	
да	11	1 (9.09)	10 (90.91)	p=1.0
не	2	0	2 (100)	
вкупно	13	1	12	

Pearson Chi-square – two tailed

Сите изолати на *Enterobacter*, со/без потенцијал за биофилм беа изолирани кај пациенти со неуспешен третман (табела 21).

Табела 21. Приказ на успешност на третманот кај *Enterobacter*

<i>Enterobacter</i> прв брис има потенцијал	Третман		
	n	успешен n (%)	неуспешен n (%)
да	12	0	12 (100)
не	1	0	1 (100)
вкупно	13	0	13

Pearson Chi-square – two tailed

Сите изолати на *Stenotrophomonas*, со/без потенцијал за биофилм беа изолирани кај пациенти со неуспешен третман (табела 22)

Табела 22. Приказ на успешност на третманот кај *Stenotrophomonas*

<i>Stenotrophomonas</i> прв брис има потенцијал	Третман			p-level
	n	успешен n (%)	неуспешен n (%)	
да	1	0	1 (100)	p=0.
не	2	0	2 (100)	
вкупно	3	0	3	

Pearson Chi-square – two tailed

Од останатите изолати беа добиени следните резултати: 2 изолати на *Candida* со потенцијал за создавање биофилм беа најдени кај пациенти со успешен третман; изолатот на *Acinetobacter* беше со потенцијал за биофилм изолиран кај пациент со неуспешен третман; 3 изолати на *Corynebacterium gr.JK* со потенцијал за создавање биофилм беа најдени кај пациенти со неуспешен третман; 4 изолати на *Serratia* без потенцијал за создавање биофилм беа најдени кај пациенти со неуспешен третман; изолатот на *Недиференцирани Грам(-) бацили* беше со потенцијал за биофилм изолиран кај пациент со неуспешен третман; изолатот на *Achromobacter denitrificans* беше со потенцијал за биофилм изолиран кај пациент со неуспешен третман.

Пред почеток на третманот, во групата пациенти со изолат на микроорганизми, просечната површина на раната изнесуваше $8.69 \pm 6.8 \text{ cm}^2$ кај пациентите со изолат со потенцијал за создавање биофилм и $9.79 \pm 8.1 \text{ cm}^2$ кај пациентите со изолат без потенцијал за биофилм; медијаната на површината на раната изнесуваше 6.88 cm^2 кај пациентите со изолат со потенцијал за создавање

биофилм и 6.51 cm^2 кај пациентите со изолат без потенцијал за биофилм. Не беше најдена статистичка сигнификантна разлика во површината на раните кај пациентите со изолат со и без потенцијал за создавање на биофилм пред третман ($p=0.716$)(табела 23).

Статистички несигнификантна беше разликата во површината на раната кај пациентите со изолат со/без потенцијал за создавање биофилм во тек и по спроведениот третман ($p=0.623$, $p=0.588$, $p=0.571$ и $p=0.716$, соодветно првата, втората, третата и четвртата недела по почетокот на третманот). Во сите анализирани временски точки, поголема површина на рана беше измерена кај пациентите од групата со изолат без потенцијал за создавање на биофилм во споредба со пациентите од групата со изолат со потенцијал за биофилм, но разликите беа недоволни за статистичка сигнификантност(табела 23).

Една недела по третманот просечната површина на раната изнесуваше $7.73 \pm 6.5 \text{ cm}^2$ во групата со потенцијал за биофилм и $9.09 \pm 8.1 \text{ cm}^2$ во групата без потенцијал за биофилм; медијаната на површината на раната изнесуваше 5.83 cm^2 во групата со потенцијал за биофилм, 6.21 cm^2 во групата без потенцијал за биофилм(табела 23).

Втората недела од третманот просечната површина на раната изнесуваше $6.91 \pm 6.1 \text{ cm}^2$ во групата со потенцијал за биофилм и $8.09 \pm 7.1 \text{ cm}^2$ во групата без потенцијал за биофилм; медијаната на површината на раната изнесуваше 4.81 cm^2 во групата со потенцијал за биофилм, 5.82 cm^2 во групата без потенцијал за биофилм (табела 23).

По 3 недели од третманот површината на раната беше 6.22 ± 5.8 во групата со и $7.09 \pm 6.5 \text{ cm}^2$ во групата без потенцијал за биофилм; 4.49 и 5.51 cm^2 беше медијаната на површината на раната кај пациентите со/без потенцијал за биофилм(табела 23).

По 4 недели третман, просечната површина на раната беше идентична кај пациентите со/без потенцијал за создавање на биофилм (5.78 cm^2); медијаната на површината на раната изнесуваше 4.09 cm^2 во групата со потенцијал за биофилм, 5.33 cm^2 во групата без потенцијал за биофилм(табела 23).

Табела 23. Анализа со Ман-Витни тест на меѓугрупните разлики во површината на хроничните рани во зависност од потенцијалот за создавање биофилм кај испитуваните групи на неделно ниво

изолати со/без потенцијал за биофилм	статистички параметри – рана површина				p-level
	n	mean ± SD	min - max	median (IQR)	
0 недела					
без потенцијал	11	9.79 ± 8.1	1.54 – 29.08	6.51(4.84 – 13.8)	Z=0.36 p=0.716
со потенцијал	56	8.69 ± 6.8	1.22 – 33.54	6.88(3.43 – 11.01)	
1 недела					
без потенцијал	11	9.09 ± 8.1	1.08 – 28.78	6.21(4.4 – 12.87)	Z=0.49 p=0.623
со потенцијал	56	7.73 ± 6.5	1.14 – 32.18	5.83(2.45 – 9.96)	
2 недела					
без потенцијал	11	8.09 ± 7.1	0.95 – 25.84	5.82(3.79 – 11.54)	Z=0.54 p=0.588
со потенцијал	56	6.91 ± 6.1	0.89 – 29.69	4.81(1.91 – 9.06)	
3 недела					
без потенцијал	11	7.09 ± 6.5	0.81 – 24.15	5.51(2.85 – 9.95)	Z=0.567 p=0.571
со потенцијал	56	6.22 ± 5.8	0.63 – 28.19	4.49(1.63 – 8.09)	
4 недела					
без потенцијал	11	5.78 ± 4.5	0.54 – 15.88	5.33(2.51 – 7.88)	Z=0.364 p=0.716
со потенцијал	56	5.78 ± 5.7	0.24 – 27.55	4.09(1.46 – 7.51)	

Mann-Whitney U Test

Во групата пациенти со изолирани микроорганизми,застрапувањето на раната не зависеше сигнификантно од нивниот потенцијал за продукција на биофилм (p=0.863).Третманот на раната беше успешен кај 9 (16.07%) пациенти со и 2 (18.18%) пациенти без потенцијал за создавање биофилм (табела 24).

Табела 24. Приказ на успешноста на третманот во зависност од потенцијалот за создавање биофилм

третман	изолат / потенцијал за биофилм			p-level
	n	без n (%)	со n (%)	
успешен	11	2 (18.18)	9 (16.07)	$X^2=0.03$ $p=0.86$
неуспешен	56	9 (81.82)	47 (83.93)	
вкупно	67	11	56	

X^2 (Chi square test)

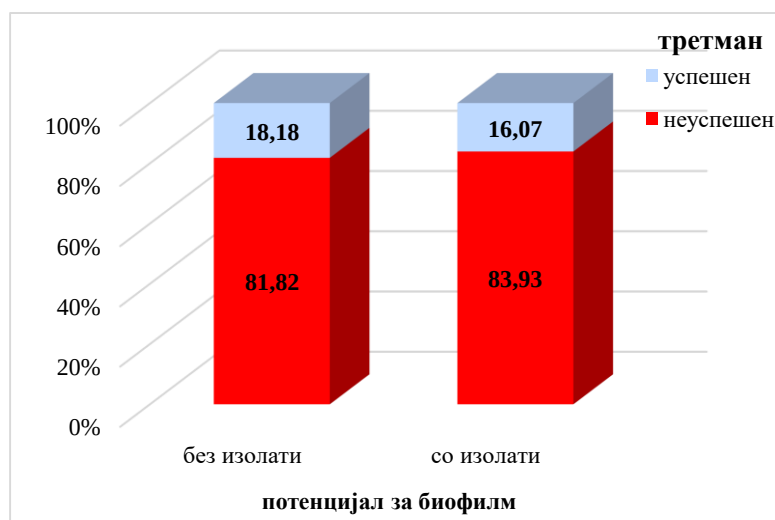


График 12. Графички приказ на успешноста на третманот во зависност од потенцијалот за создавање биофилм

5.3.3 Влијание на степенот на создавање на биофилм врз заздравувањето

Заздравувањето на раната сигнификантно зависеше од степенот на продукција на биофилм ($p=0.0006$). Заздравување на раната беше забележано кај 6 (50%) пациенти со слаб потенцијал за создавање биофилм, 2 (16.67%) пациенти со умерен и 1 (3.13%) пациенти со силен потенцијал за биофилм (табела 25).

Меѓугрупната компарација на изолатите со слаб, умерен и силен потенцијал за создавање биофилм покажа сигнификантна разлика меѓу групите со слаб и силен потенцијал, односно, третманот на раната беше значајно почесто поуспешен кај пациентите со изолат со слаб потенцијал за биофилм споредено со пациентите со изолат со силен потенцијал – 6 (50%) vs 1 (3.13%), $p=0.0008$ (табела 25).

Табела 25. Фишеров тест за сигнификантност на успешност на третманот во групите во зависност од потенцијалот за создавање биофилм на изолатите

третман	изолат со потенцијал за биофилм				p-level
	n	слаб n (%)	умерен n (%)	силен n (%)	
успешен	9	6 (50)	2 (16.67)	1 (3.13)	Fisher's exact test ***p=0.0006
неуспешен	47	6 (50)	10 (83.33)	31 (96.88)	
вкупно	56	12	12	32	

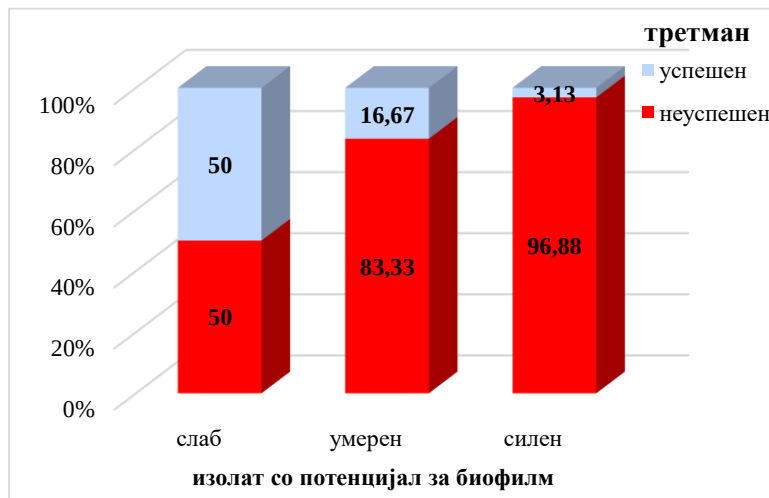


График 13. Графички приказ на процентуална застапеност на успешен наспроти неуспешен третман во групите со различен потенцијал за создавање биофилм

Во групата пациенти со изолати кои формираат биофилм, пред третманот, не беше најдена статистичка сигнификантна разлика во површината на раната меѓу групите со слаб, умерен и силен потенцијал за создавање биофилм ($p=0.09$). Во групите со слаб, умерен и силен потенцијал просечната површина на раната изнесуваше 5.45 ± 3.6 , 6.95 ± 4.1 и $10.56 \pm 7.8 \text{ cm}^2$, соодветно; медијаната на површината на раната беше 4.86, 6.39 и 8.52 cm^2 , соодветно (табела 26).

Површината на раната сигнификантно зависеше од степенот на продукција на биофилм во целиот едномесечен третман (вкупна статистичка сигнификантна разлика од $p=0.0011$, $p=0.007$, $p=0.0032$ и $p=0.0028$, соодветно по 1, 2, 3 и 4 недели третман) (табела 26).

Една недела по третманот, просечната површина на раната беше највисока во групата со силен потенцијал за биофилм ($9.81 \pm 7.5 \text{ cm}^2$), следено со групата со умерен и слаб потенцијал (6.11 ± 3.9 и $3.80 \pm 2.9 \text{ cm}^2$, соодветно); медијаната на површината на раната изнесуваше во овие групи 8.28, 5.56 и 2.61 cm^2 , соодветно. Post-hoc анализата за меѓугрупни споредби покажа дека вкупната статистичка сигнификантност се должи на значајно поголема површина на раната кај пациентите со изолат со силен наспроти слаб потенцијал за биофилм ($p=0.0096$) (табела 26).

По 2 недели третман просечната површина на раната изнесуваше $8.90 \pm 6.9 \text{ cm}^2$ во групата со силен потенцијал за биофилм, $5.31 \pm 3.5 \text{ cm}^2$ во групата со умерен потенцијал за биофилм и $3.19 \pm 2.8 \text{ cm}^2$ во групата со слаб потенцијал за биофилм; медијаната на површината на раната изнесуваше 7.84 cm^2 во групата со силен потенцијал за биофилм, 5.11 cm^2 во групата со умерен потенцијал за биофилм и 2.06 cm^2 во групата со слаб потенцијал за биофилм. Вкупната статистичка сигнификантна разлика меѓу групите се должи на значајно поголема површина на раната кај пациентите со силен наспроти слаб потенцијал за биофилм (post-hoc $p=0.0054$) (табела 26).

По 3 недели од третманот површината на раната имаше просечна вредност и медијана од 8.16 ± 6.7 и 7.07 cm^2 во групата со силен потенцијал за биофилм, 4.59 ± 3.0 и 4.47 cm^2 во групата со умерен потенцијал, 2.68 ± 2.7 и 1.45 cm^2 во групата со слаб потенцијал за биофилм. Post-hoc анализата за меѓугрупни споредби покажа дека вкупната статистичка сигнификантност се должи на значајно поголема површина на раната кај пациентите со силен наспроти слаб потенцијал за биофилм ($p=0.0024$) (табела 26).

И четвртата недела од почетокот на третманот, просечната површина на раната беше највисока во групата со силен потенцијал за биофилм ($7.66 \pm 6.6 \text{ cm}^2$), следено со групата со умерен и слаб потенцијал (4.26 ± 2.8 и $2.29 \pm 2.3 \text{ cm}^2$, соодветно); медијаната на површината на раната изнесуваше во овие групи 6.51, 4.16 и 1.34 cm^2 , соодветно. Post-hoc анализата за меѓугрупни споредби покажа дека вкупната статистичка сигнификантност се должи на значајно поголема површина на раната кај пациентите со изолат со силен наспроти слаб потенцијал за биофилм ($p=0.0021$) (табела 26).

Табела 26. Крускал-Вилисов тест на разликите во намалувањето на површината на хроничните рани помеѓу испитуваните групи во зависност од потенцијалот за создавање биофилм на неделно ниво

изолати со/без потенцијал за биофилм	статистички параметри површина на рана				p-level
	n	mean ± SD	min - max	median (IQR)	
0 недела					
слаб	12 (	5.45 ± 3.6	1.22 – 12.6	4.86(2.52 – 7.26)	H=4.78 p=0.09
умерен	12 (	6.95 ± 4.1	1.98 – 16.42	6.39(3.77 – 9.27)	
силен	32 (	10.56 ± 7.8	1.63 – 33.54	8.52(4.26 – 16.2)	
1 недела					
слаб	12 (	3.80 ± 2.9	1.14 – 11.34	2.61(1.63 – 5.17)	H=8.96 p=0.011 1vs3 p=0.0096
умерен	12 (	6.11 ± 3.9	1.37 – 14.65	5.56(2.79 – 8.55)	
силен	32 (	9.81 ± 7.5	1.55 – 32.18	8.28(3.77 – 14.66)	
2 недела					
слаб	12 (	3.19 ± 2.8	0.89 – 10.72	2.06(1.19 – 4.51)	H=9.94 p=0.007 1vs3 p=0.0054
умерен	12 (	5.31 ± 3.5	1.07 – 12.15	5.11(1.97 – 7.51)	
силен	32 (	8.90 ± 6.9	1.32 – 29.69	7.84(3.03 – 13.18)	
3 недела					
слаб	12 (	2.68 ± 2.7	0.63 – 9.78	1.45(0.83 – 3.86)	H=11.47 p=0.0032 1vs3 p=0.0024
умерен	12 (	4.59 ± 3.0	0.94 – 10.66	4.47(1.79 – 6.27)	
силен	32 (	8.16 ± 6.7	1.23 – 28.19	7.07(2.56 – 10.88)	
4 недела					
слаб	12 (	2.29 ± 2.3	0.24 – 7.97	1.34(0.68 – 3.5)	H=11.73 p=0.0028 1vs3 p=0.0021
умерен	12 (	4.26 ± 2.8	0.76 – 9.58	4.16(1.61 – 6.01)	
силен	32 (	7.66 ± 6.6	0.93 – 27.55	6.51(2.3 – 10.48)	

Kruskal-Wallis test

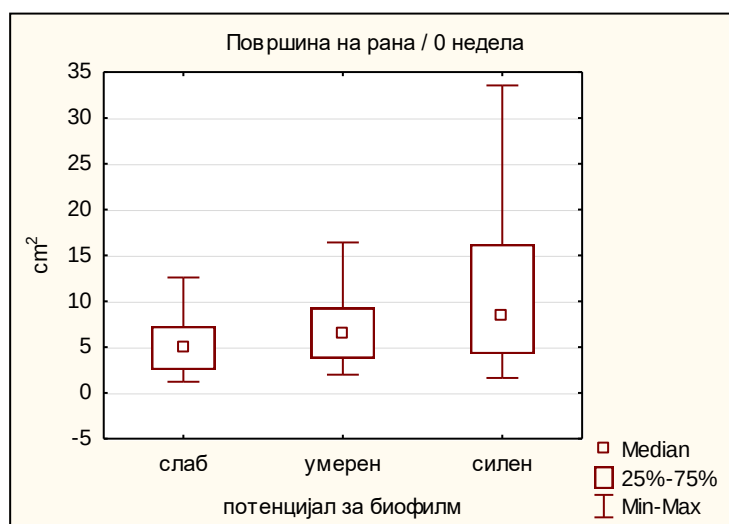


График 14. Графички приказ на дистрибуцијата на резултатите и средните вредности со стандардните девијации на површината на хроничните рани во 0-та недела

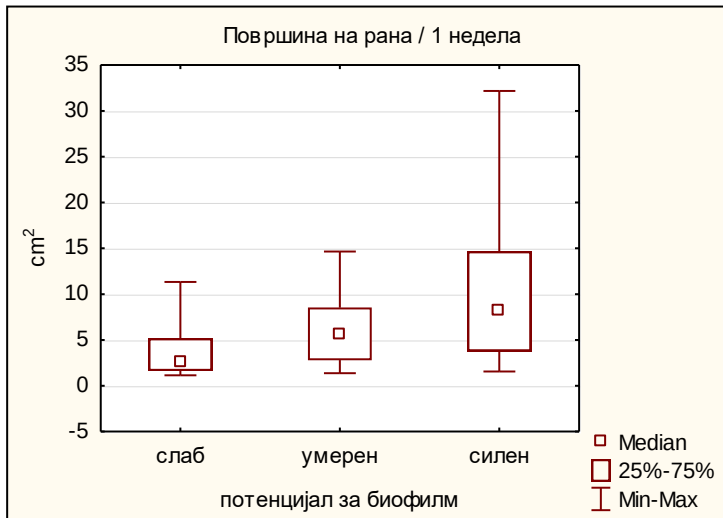


График 14а. Графички приказ на дистрибуцијата на резултатите и средните вредности со стандардните девијации на површината на хроничните рани во 1-та недела

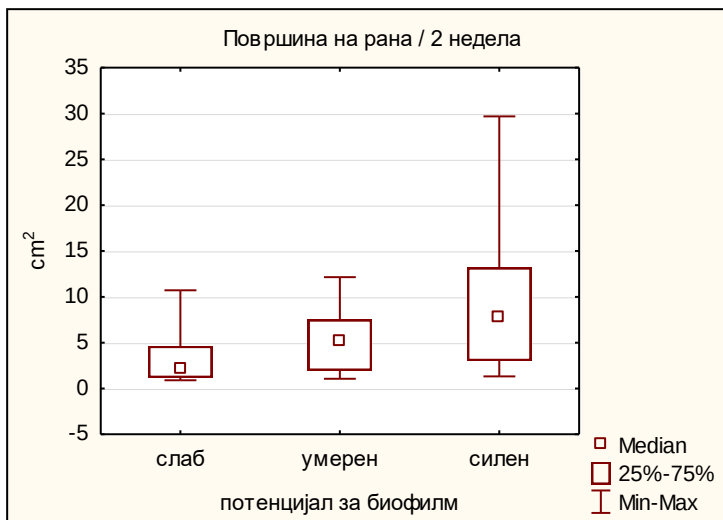


График 14б. Графички приказ на дистрибуцијата на резултатите и средните вредности со стандардните девијации на површината на хроничните рани во 2-та недела

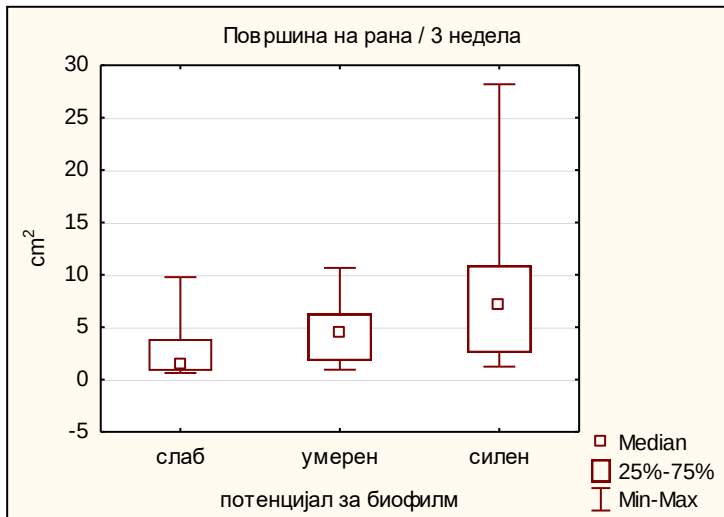


График 14в. Графички приказ на дистрибуцијата на резултатите и средните вредности со стандардните девијации на површината на хроничните рани во 3-та недела

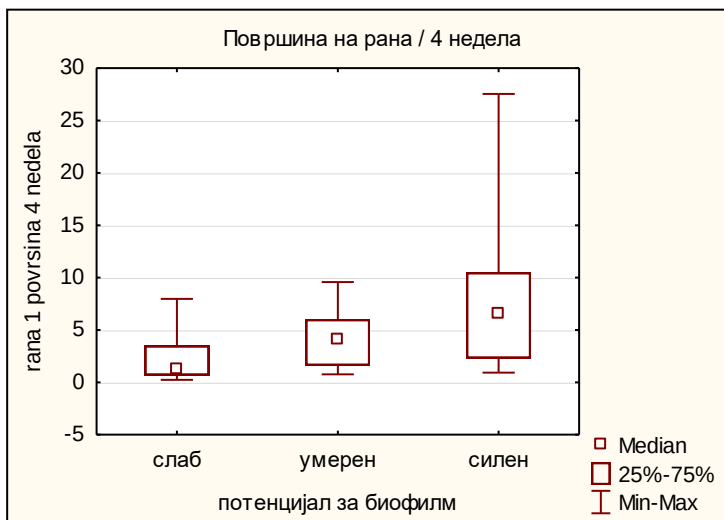


График 14г. Графички приказ на дистрибуцијата на резултатите и средните вредности со стандардните девијации на површината на хроничните рани во 4-та недела

5.4 Антимикробна осетливост/резистентност на изолатите

Резултатите прикажани во овој дел од докторската дисертација се однесуваат на антимикробната осетливост на бактериите изолирани кај пациентите со хронични рани.

Кон penicilin беа резистентни сите 5(100%) бактерии од видот *MRSA*. Бактериските изолати на *MSSA* исто така најчесто беа резистентни кон penicilin, 21/23 (91.3%); останатите 2 (8.7%) беа осетливи (табела 27а).

Табела 27а. Приказ на антимикробна осетливост на *MRSA* и *MSSA*

варијабла	n	penicillin		
		S	I	R
<i>MRSA</i>	5			5 (100%)
<i>MSSA</i>	24	2(8.7%)		21 (91.3%)

Кон cefoxitin, flucoxacin, ceftriaxon и cefotaxim беа отпорни сите бактериски изолати на *MRSA* и само 2 (2.98%) изолати на *MSSA*. Наодот од антибиограмот бактериите од видот *MSSA* најчесто ги презентираше како осетливи кон овие антибиотици - 22(91.67%)(табела 27б,в,г,д).

Табела 27б. Приказ на антимикробна осетливост на *MRSA* и *MSSA*

варијабла	n	cefoxitin		
		S	I	R
<i>MRSA</i>	5			5 (100%)
<i>MSSA</i>	24	22 (91.67%)		2 (14.33%)

Табела 27в. Приказ на антимикробна осетливост на *MRSA* и *MSSA*

варијабла	n	flucoxacin		
		S	I	R
<i>MRSA</i>	5			5 (100%)
<i>MSSA</i>	24	22 (91.67%)		2 (2.98%)

Табела 27г. Приказ на антимикробна осетливост на *MRSA* и *MSSA*

варијабла	n	ceftriaxon		
		S	I	R
<i>MRSA</i>	5			5 (100%)
<i>MSSA</i>	24	22 (91.67%)		2 (2.98%)

Табела 27д. Приказ на антимикробна осетливост на *MRSA* и *MSSA*

варијабла	n	cefotaxim		
		S	I	R
<i>MRSA</i>	5			5 (100%)
<i>MSSA</i>	24	22 (91.67%)		2 (2.98%)

Од 5 изолати на *MRSA* 1(20%) беше осетлив, останатите 4(80%) изолати беа отпорни кон eritromycin, azithromycin и klaritromycin. Од 23 изолати на *MSSA* испитувани кон eritromycin, azithromycin и klaritromycin, 22 (95.65%) беа осетливи(табела 27ѓ,е,ж).

Табела 27ѓ. Приказ на антимикробна осетливост на *MRSA* и *MSSA*

варијабла	n	eritromycin		
		S	I	R
<i>MRSA</i>	5	1 (20%)		4 (80%)
<i>MSSA</i>	23	22 (95.65%)		1 (4.35%)

Табела 27е. Приказ на антимикробна осетливост на *MRSA* и *MSSA*

варијабла	n	azithromycin		
		S	I	R
<i>MRSA</i>	5	1 (20%)		4 (80%)
<i>MSSA</i>	23	22 (95.65%)		1 (4.35%)

Табела 27ж. Приказ на антимикробна осетливост на *MRSA* и *MSSA*

варијабла	n	klaritromycin		
		S	I	R
<i>MRSA</i>	5	1 (20%)		4 (80%)
<i>MSSA</i>	23	22 (95.65%)		1 (4.35%)

Кон ciprofloxacin 1(20%) изолат на *MRSA* беше осетлив, 3(20%) изолати беа отпорни, 1(20%) изолат беше со интермедиерна осетливост. Од 17 изолати на *MSSA* чија осетливост беше испитувана кон ciprofloxacin, 2 (11.76%) изолати беа осетливи, исто толку изолати беа отпорни, 13(76.47%) покажуваа интермедиерна осетливост кон ciprofloxacin(табела 27з).

Табела 27з. Приказ на антимикробна осетливост на *MRSA* и *MSSA*

варијабла	n	ciprofloxacin		
		S	I	R
<i>MRSA</i>	5	1 (20%)	1 (20%)	3 (60%)
<i>MSSA</i>	17	2 (11.76%)	13 (76.47%)	2 (11.76%)

Изолатите на *MRSA* кон gentamycin најчесто беа отпорни – 4/5 (80%), осетлив беше 1(20%) изолат. Изолатите на *MSSA* кон gentamycin најчесто беа осетливи –

20/24 (83.33%), останатите 4 изолати на оваа бактерија кон овој антибиотик презентираа отпорност(табела 27s).

Табела 27s. Приказ на антимикробна осетливост на *MRSA* и *MSSA*

варијабла	n	gentamycin		
		S	I	R
<i>MRSA</i>	5	1 (20%)		4 (80%)
<i>MSSA</i>	24	20 (83.33%)		4 (16.67%)

Кон kotrimoxazole беа осетливи 4/5(100%) бактерии од видот *MRSA* и сите изолати на *MSSA*(табела 27и).

Табела 27и. Приказ на антимикробна осетливост на *MRSA* и *MSSA*

варијабла	n	kotrimoxazole		
		S	I	R
<i>MRSA</i>	5	4 (80%)		1 (20%)
<i>MSSA</i>	22	22 (100%)		

Кон clindamycin беа осетливи 1/5(20%) бактерии од видот *MRSA* и сите изолати на *MSSA*.Изолатите на *MRSA* најчесто беа отпорни кон clindamycin – 4/5 (80%)(табела 27j).

Табела 27j. Приказ на антимикробна осетливост на *MRSA* и *MSSA*

варијабла	n	clindamycin		
		S	I	R
<i>MRSA</i>	5	1 (20%)		4 (80%)
<i>MSSA</i>	24	24 (100%)		

Сите изолати на *MRSA* и *MSSA* беа осетливи кон rifampicin, linezolid, vancomycin и ceftaroline fosamil(табела 27к,л,љ,м)

Табела 27к. Приказ на антимикробна осетливост на *MRSA* и *MSSA*

варијабла	n	rifampicin		
		S	I	R
<i>MRSA</i>	5	5 (100%)		
<i>MSSA</i>	24	24 (100%)		

Табела 27л. Приказ на антимикробна осетливост на *MRSA* и *MSSA*

варијабла	n	linezolid		
		S	I	R
<i>MRSA</i>	5	5 (100%)		
<i>MSSA</i>	24	24 (100%)		

Табела 27љ. Приказ на антимикробна осетливост на *MRSA* и *MSSA*

варијабла	n	vancomycin		
		S	I	R
<i>MRSA</i>	5	5 (100%)		
<i>MSSA</i>	24	24 (100%)		

Табела 27м. Приказ на антимикробна осетливост на *MRSA* и *MSSA*

варијабла	n	ceftaroline fosamil		
		S	I	R
<i>MRSA</i>				
<i>MSSA</i>	10	10 (100%)		

Сите изолати на *Corynebacterium* беа отпорни кон Penicillin, Ciprofloxacin, Rifampicin, Gentamicin и Clindamicin, а осетливи кон Vancomycin и Linezolid (табела 28).

Табела 28. Приказ на антимикробна осетливост на *Corynebacterium*

варијабла	<i>Corynebacterium</i>		
	S	I	R
Penicillin			3 (100%)
Ciprofloxacin			3 (100%)
Rifampicin			3 (100%)
Gentamicin			3 (100%)
Clindamicin			3 (100%)
Vancomycin	3 (100%)		
Linezolid	3 (100%)		

Кон ampicillin/amoxicillin беа осетливи 4/5 (80%) изолати на *Escherichia coli* и сите изолати на *Enterococcus*. Сите изолати на *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter*, *Acinetobacter*, *Stenotrophomonas*, *Serratia* и Недиференцирани Грам(-) бацили беа отпорни кон овој антибиотик (табела 29а).

Табела 29а. Приказ на антимикробна осетливост на Грам(-) бактерии

варијабла	n	ampicillin/amoxicillin		
		S	I	R
<i>Escherichia coli</i>	5	4 (80%)		1 (20%)
<i>Proteus mirabilis</i>	7			7 (100%)
<i>Enterococcus</i>	7	7 (100%)		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7			7 (100%)
<i>Enterobacter</i>	16			16 (100%)
<i>Acinetobacter</i>	1			1 (100%)
<i>Stenotrophomonas</i>	4			4 (100%)
<i>Serratia</i>	4			4 (100%)
Недиференцирани Грам(-) бацили	1			1 (100%)

Кон amoxicillin-clavulanate беа осетливи 4/5 (80%) изолати на *Escherichia coli*, 1/5 (40%) изолати на *Proteus* и сите изолати на *Enterococcus*. Сите изолати на *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter*, *Acinetobacter*, *Stenotrophomonas*, *Serratia* и Недиференцирани грам(-)бацили беа отпорни кон овој антибиотик (табела 29б).

Табела 29б. Приказ на антимикробна осетливост на Грам(-) бактерии

варијабла	n	amoxicillin-clavulanate		
		S	I	R
<i>Escherichia coli</i>	5	4 (80%)		1 (20%)
<i>Proteus</i>	5	2 (40%)		3 (60%)
<i>Enterococcus</i>	7	7 (100%)		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7			7 (100%)
<i>Enterobacter</i>	17			17 (100%)
<i>Acinetobacter</i>	1			1 (100%)
<i>Stenotrophomonas</i>	3			3 (100%)
<i>Serratia</i>	4			4 (100%)
Недиференцирани Грам(-) бацили	1			1 (100%)

Од 5 изолати на *Escherichia coli* чија осетливост беше испитувана кон piperacillin-tazobactam, 4 (80%) изолати презентираа осетливост; од 17 изолати на *Enterobacter*, осетливи кон piperacillin-tazobactam беа 16 (94.12%) изолати; осетливост кон piperacillin-tazobactam беше детектирана и кај сите изолати на *Proteus*, *Enterococcus*, *Serratia* и Недиференцирани грам(-) бацили.

Кон piperacillin-tazobactam беше забележана интермедиерна осетливост само кај 8/10 (80%) изолати на *Pseudomonas aeruginosa*. Отпорни беа 1 (20%) изолати на *Escherichia coli*, 2/10 (20%) изолати на *Pseudomonas aeruginosa*, и сите изолати на *Stenotrophomonas* и *Serratia*. (табела 29в).

Табела 29в. Приказ на антимикробна осетливост на Грам(-) бактерии

варијабла	n	piperacillin-tazobactam		
		S	I	R
<i>Escherichia coli</i>	5	4 (80%)		1 (20%)
<i>Proteus mirabilis</i>	7	7 (100%)		
<i>Enterococcus</i>	7	7 (100%)		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10		8 (80%)	2 (20%)
<i>Enterobacter</i>	17	16 (94.12%)		1 (5.88%)
<i>Acinetobacter</i>	1	1 (100%)		
<i>Stenotrophomonas</i>	3			3 (100%)
<i>Serratia</i>	4	1 (25%)		3 (75%)
Недиференцирани Грам(-) бацили	1	1 (100%)		

Сите изолати на *Escherichia coli*, *Proteus* и *Serratia*, 16/17 (94.12%) изолати на *Enterobacter* и 2/4 (50%) изолати на *Stenotrophomonas* беа осетливи кон ertapenem; 2/9 (22.22%) изолати на *Pseudomonas aeruginosa* покажаа интермедиерна осетливост, додека отпорност кон ertapenem беше забележана кај 7/9 (77.78%) изолати на *Pseudomonas aeruginosa*, 1/17 (5.88%) изолати на *Enterobacter*, 2/4 (50%) изолати на *Stenotrophomonas*, сите изолати на *Acinetobacter* и Недиференцирани Грам(-) бацили (табела 29г).

Табела 29г. Приказ на антимикробна осетливост на Грам(-) бактерии

варијабла	n	ertapenem		
		S	I	R
<i>Escherichia coli</i>	9	9 (100%)		
<i>Proteus</i>	7	7 (100%)		
<i>Enterococcus</i>				
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9		2 (22.22%)	7 (77.78%)
<i>Enterobacter</i>	17	16 (94.12%)		1 (5.88%)
<i>Acinetobacter</i>	1			1 (100%)
<i>Stenotrophomonas</i>	4	2 (50%)		2 (50%)
<i>Serratia</i>	4	4 (100%)		
Недиференцирани Грам(-) бацили	1			1 (100%)

Осетливи кон imipenem беа сите изолати на *Escherichia coli*, *Proteus*, *Acinetobacter* и *Serratia*, и 16/17 (94.12%) изолати на *Enterobacter*; интермедиерна осетливост имаа 10 (90.91%) изолати на *Pseudomonas aeruginosa*; отпорни кон

imipenem беа 1/11 (9.09%) изолати на *Pseudomonas aeruginosa*, 1/17 (5.88%) изолати на *Enterobacter*, и сите изолати на *Stenotrophomonas* и Недиференцирани Грам(-) бацили (табела 29д).

Табела 29д. Приказ на антимикробна осетливост на Грам(-) бактерии

варијабла	n	imipenem		
		S	I	R
<i>Escherichia coli</i>	9	9 (100%)		
<i>Proteus</i>	7	7 (100%)		
<i>Enterococcus</i>				
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11		10 (90.91%)	1 (9.09%)
<i>Enterobacter</i>	17	16 (94.12%)		1 (5.88%)
<i>Acinetobacter</i>	1	1 (100%)		
<i>Stenotrophomonas</i>	4			4 (100%)
<i>Serratia</i>	4	4 (100%)		
Недиференцирани Грам(-) бацили	1			1 (100%)

Сите изолати на *Escherichia coli*, *Proteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter*, *Serratia* и Недиференцирани Грам(-) бацили беа осетливи кон meropenem, *Stenotrophomonas* претставен со 1 изолат беше отпорен кон meropenem; 16/17 (94.12%) изолати на *Enterobacter* беа осетливи, 1/17 (5.88%) изолат беше отпорен на овој антибиотик (табела 29ѓ).

Табела 29ѓ. Приказ на антимикробна осетливост на Грам(-) бактерии

варијабла	N	meropenem		
		S	I	R
<i>Escherichia coli</i>	5	5 (100%)		
<i>Proteus</i>	6	6 (100%)		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11	11 (100%)		
<i>Enterobacter</i>	17	16 (94.12%)		1 (5.88%)
<i>Acinetobacter</i>	1	1 (100%)		
<i>Stenotrophomonas</i>	1			1 (100%)
<i>Serratia</i>	2	2 (100%)		
Недиференцирани Грам(-) бацили	1	1 (100%)		

Кон cefuroxime осетливи беа 6/17 (35.29%) изолати на *Enterobacter* и изолатот од *Acinetobacter*; интермедиерно осетливи беа 8/9 (88.89%) изолати на *Escherichia coli*; 4/7 (57.14%) изолати на *Proteus* и 1/17 (5.88%) изолати на *Enterobacter*; отпорни

кон cefuroxime беа 1/9 (11.11%) изолати на *Escherichia coli*, 3/7 (42.86%) изолати на *Proteus*, 10/17 (58.82%) изолати на *Enterobacter* и сите изолати на *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas*, *Serratia* и Недиференцирани Грам(-) бацили(табела 29е).

Табела 29е. Приказ на антимикробна осетливост на Грам(-) бактерии

варијабла	n	cefuroxime		
		S	I	R
<i>Escherichia coli</i>	9		8 (88.89%)	1 (11.11%)
<i>Proteus</i>	7		4 (57.14%)	3 (42.86%)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9			9 (100%)
<i>Enterobacter</i>	17	6 (35.29%)	1 (5.88%)	10 (58.82%)
<i>Acinetobacter</i>	1	1 (100%)		
<i>Stenotrophomonas</i>	4			4 (100%)
<i>Serratia</i>	4			4 (100%)
Недиференцирани Грам(-) бацили	1			1 (100%)

Сите изолати на *Escherichia coli* и *Proteus* беа осетливи кон ceftazidime; сите изолати на *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter*, *Stenotrophomonas*, *Serratia* и Недиференцирани Грам(-) бацили; од 17 изолати на *Enterobacter* испитувани на осетливост кон ceftazidime, 6 (35.29%) беа осетливи, останатите 11 (64.71%) беа отпорни(табела 29ж).

Табела 29ж. Приказ на антимикробна осетливост на Грам(-) бактерии

варијабла	n	ceftazidime		
		S	I	R
<i>Escherichia coli</i>	9	9 (100%)		
<i>Proteus</i>	7	7 (100%)		
<i>Enterococcus</i>				
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2			2 (100%)
<i>Enterobacter</i>	17	6 (35.29%)		11 (64.71%)
<i>Acinetobacter</i>	1			1 (100%)
<i>Stenotrophomonas</i>	4			4 (100%)
<i>Serratia</i>	4			4 (100%)
Недиференцирани Грам(-) бацили	1			1 (100%)

Осетливи кон ceftriaxone беа 2/3 (66.67%) изолати на *Escherichia coli*, сите изолати на *Proteus* и 6/17 (35.29%) изолати на *Acinetobacter*;отпорни кон ceftriaxone беа 1/3 (33.33%) изолати на *Escherichia coli*, 11/17 (64.71%) изолати на *Enterobacter*,

и сите изолати на *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter*, *Stenotrophomonas* и *Serratia* (табела 29з).

Табела 29з. Приказ на антимикробна осетливост на Грам(-) бактерии

варијабла	n	ceftriaxone		
		S	I	R
<i>Escherichia coli</i>	3	2 (66.67%)		1 (33.33%)
<i>Proteus</i>	7	7 (100%)		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4			4 (100%)
<i>Enterobacter</i>	17	6 (35.29%)		11 (64.71%)
<i>Acinetobacter</i>	1			1 (100%)
<i>Stenotrophomonas</i>	3			3 (100%)
<i>Serratia</i>	4			4 (100%)

Кон сефепиме беа осетливи 4/5 (80%) изолати на *Escherichia coli*, сите изолати на *Proteus* и 14/16 (87.5%) изолати на *Enterobacter*; отпорни кон сефепиме беа 1/5 (20%) изолати на *Escherichia coli*, 2/12 (16.67%) изолати на *Pseudomonas aeruginosa*, сите изолати на *Acinetobacter*, *Stenotrophomonas*, *Serratia* и Недиференцирани Грам(-) бацили; 10/12 (83.33%) изолати на *Pseudomonas aeruginosa* беа со интермедиерна осетливост кон сефепиме (табела 29с).

Табела 29с. Приказ на антимикробна осетливост на Грам(-) бактерии

варијабла	n	cefepime		
		S	I	R
<i>Escherichia coli</i>	5	4 (80%)		1 (20%)
<i>Proteus mirabilis</i>	7	7 (100%)		
<i>Enterococcus</i>				
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12		10 (83.33%)	2 (16.67%)
<i>Enterobacter</i>	16	14 (87.5%)		2 (12.5%)
<i>Acinetobacter</i>	1			1 (100%)
<i>Stenotrophomonas</i>	3			3 (100%)
<i>Serratia</i>	4			4 (100%)
Недиференцирани Грам(-) бацили	1			1 (100%)

Осетливи кон gentamicin беа 8/9 (88.89%) изолати на *Escherichia coli*, сите изолати на *Proteus*, 6/7 (85.71%) изолати на *Enterococcus*, 4/8 (50%) изолати на *Pseudomonas aeruginosa* и 5/17 (29.41%) изолати на *Enterobacter*; отпорни кон gentamicin беа 1/9 (11.11%) изолати на *Escherichia coli*, 1/7 (14.29%) изолати на

Enterococcus, 2/8 (25%) изолати на *Pseudomonas aeruginosa*, сите изолати на *Acinetobacter*, *Stenotrophomonas*, *Serratia* и *Nediferencirani gr(-) bacilli*; 2/8 (25%) изолати на *Pseudomonas aeruginosa* беа со интермедиерна осетливост кон gentamicin (табела 29и).

Табела 29и. Приказ на антимикробна осетливост на Грам(-) бактерии

варијабла	n	gentamicin		
		S	I	R
<i>Escherichia coli</i>	9	8 (88.89%)		1 (11.11%)
<i>Proteus mirabilis</i>	7	7 (100%)		
<i>Enterococcus</i>	7	6 (85.71%)		1 (14.29%)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8	4 (50%)	2 (25%)	2 (25%)
<i>Enterobacter</i>	17	5 (29.41%)		12 (70.59%)
<i>Acinetobacter</i>	1			1 (100%)
<i>Stenotrophomonas</i>	4			4 (100%)
<i>Serratia</i>	4			4 (100%)
Недиференцирани Грам(-) бацили	1			1 (100%)

Сите изолати на *Escherichia coli*, *Proteus* и *Serratia* беа осетливи кон amikacin, сите изолати на *Acinetobacter*, *Stenotrophomonas* и Недиференцирани Грам(-) бацили беа отпорни кон овој антибиотик. Од 13 изолати на *Pseudomonas aeruginosa*, 12 (92.31%) беа осетливи, 1 (7.69%) беа отпорни кон amikacin; од 17 изолати на *Enterobacter*, 16 (94.12%) беа осетливи, 1 (5.88%) отпорни кон amikacin (табела 29ј).

Табела 29ј. Приказ на антимикробна осетливост на Грам(-) бактерии

варијабла	n	amikacin		
		S	I	R
<i>Escherichia coli</i>	9	9 (100%)		
<i>Proteus mirabilis</i>	7	7 (100%)		
<i>Enterococcus</i>				
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13	12 (92.31%)		1 (7.69%)
<i>Enterobacter</i>	17	16 (94.12%)		1 (5.88%)
<i>Acinetobacter</i>	1			1 (100%)
<i>Stenotrophomonas</i>	4			4 (100%)
<i>Serratia</i>	4	4 (100%)		
Недиференцирани Грам(-) бацили	1			1 (100%)

Кон ciprofloxacin беа осетливи 4/5 (80%) изолати на *Escherichia coli*, сите изолати на *Proteus* и 10/17 (58.82%) изолати на *Enterobacter*; отпорни кон ciprofloxacin беа 1/5 (20%) изолати на *Escherichia coli*, 7/17 (41.18%) изолати на *Enterobacter*, сите

изолати на *Stenotrophomonas*, *Serratia* и Недиференцирани грам(-) бацили; сите изолати на *Pseudomonas aeruginosa* и *Acinetobacter* беа со интермедиерна осетливост кон ciprofloxacin (табела 29к).

Табела 29к. Приказ на антимикробна осетливост на Грам(-) бактерии

варијабла	n	ciprofloxacin		
		S	I	R
<i>Escherichia coli</i>	5	4 (80%)		1 (20%)
<i>Proteus mirabilis</i>	5	5 (100%)		
<i>Enterococcus</i>				
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10		10 (100%)	
<i>Enterobacter</i>	17	10 (58.82%)		7 (41.18%)
<i>Acinetobacter</i>	1		1 (100%)	
<i>Stenotrophomonas</i>	3			3 (100%)
<i>Serratia</i>	4			4 (100%)
Недиференцирани Грам(-) бацили	1			1 (100%)

Кон co-trimoxazole беа осетливи 4/5 (80%) изолати на *Escherichia coli*, 5/7 (71.43%) изолати на *Proteus*, 5/17 (29.41%) изолати на *Enterobacter*, изолатот на *Acinetobacter* и 1/2 (50%) изолати на *Stenotrophomonas*; отпорни кон co-trimoxazole беа 1/5 (20%) изолати на *Escherichia coli*, 2/7 (28.57%) изолати на *Proteus*, 12/17 (70.59%) изолати на *Enterobacter*, сите изолати на *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas* и *Serratia*; изолатот на Недиференцирани грам(-) бацили беше со интермедиерна осетливост кон co-trimoxazole (табела 29л).

Табела 29л. Приказ на антимикробна осетливост на Грам(-) бактерии

варијабла	n	co-trimoxazole		
		S	I	R
<i>Escherichia coli</i>	5	4 (80%)		1 (20%)
<i>Proteus mirabilis</i>	7	5 (71.43%)		2 (28.57%)
<i>Enterococcus</i>				
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9			9 (100%)
<i>Enterobacter</i>	17	5 (29.41%)		12 (70.59%)
<i>Acinetobacter</i>	1	1 (100%)		
<i>Stenotrophomonas</i>	2	1 (50%)		1 (50%)
<i>Serratia</i>	4			4 (100%)
Недиференцирани грам(-) бацили	1		1 (100%)	

Најголем дел од изолатите покажуваа отпорност кон colistin: сите изолати на *Proteus mirabilis*, *Stenotrophomonas*, *Serratia* и Недиференцирани Грам(-) бацили

како и 1/3 (33.33%) изолати на *Enterobacter*. Осетлив кон colistin беше изолатот на *Pseudomonas aeruginosa* и 2/3 (66.67%) изолати на *Enterobacter*(табела 29љ).

Табела 29љ. Приказ на антимикробна осетливост на Грам(-) бактерии

варијабла	n	colistin		
		S	I	R
<i>Escherichia coli</i>				
<i>Proteus mirabilis</i>	3			3 (100%)
<i>Enterococcus</i>				
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	1 (100%)		
<i>Enterobacter</i>	3	2 (66.67%)		1 (33.33%)
<i>Acinetobacter</i>				
<i>Stenotrophomonas</i>	1			1 (100%)
<i>Serratia</i>	2			2 (100%)
Недиференцирани Грам(-) бацили	1			1 (100%)

Изолатот на *Achromobacter* беше осетлив на piperacilin-tazobactam и meropenem(табела 30 а,б).

Табела 30а.Приказ на антимикробна осетливост на *Achromobacter*

варијабла	n	piperacilin-tazobactam		
		S	I	R
<i>Achromobacter</i>	1	1 (1.49)		

Табела 30б.Приказ на антимикробна осетливост на *Achromobacter*

варијабла	n	meropenem		
		S	I	R
<i>Achromobacter</i>	1	1 (1.49)		

5.4.1 Споредба на осетливоста на биофилм продуцирачките наспроти непродуцирачките изолати одредена со употреба на конвенционален метод(диск-дифузион метод)

Резултатите прикажани на табела 31 се однесуваат на антимикробната осетливост на бактериските изолати *MRSA* и *MSSA* со потенцијал за биофилм споредено со изолати без потенцијал за создавање биофилм.

Од прикажаната дистрибуција, може да се заклучи дека резистентноста кон penicillin, ceftioxin, flucloxacillin е идентична кај изолатите на *MRSA* со и без потенцијал за биофилм и изнесува 100%. Кон ciprofloxacin изолатите на *MRSA* без потенцијал за биофилм покажаа резистентност од 75%, споредено со 100% осетливост кон истиот антибиотик на изолатите со потенцијал за биофилм. Кај изолатите на *MSSA* резистентноста кон penicillin беше 94.74% во групата на изолати со потенцијал за биофилм споредено со 75% во групата на изолати без потенцијал за биофилм. Изолатите со потенцијал за биофилм покажаа резистентност од 5% кон ceftioxin, flucloxacillin наспроти 25% резистенција кај изолатите без потенцијал за биофилм. Осетливоста кон cotrimoxazole, klindamicin, rifampicin, linezolid, vankomicin и ceftaroline беше 100% и за двете групи изолати. По еден изолат од групата со и без потенцијал за биофилм покажа резистентност кон ciprofloxacin, а кон gentamicin резистентни беа 10% изолати со потенцијал, наспроти 20% изолати без потенцијал за биофилм.

Табела 31. Приказ на антимикробна осетливост на Грам(+) бактерии во зависност од потенцијалот за создавање биофилм

	Аб	Присуство на биофилм	п	Pen	Cef	Flu	Er/ Az/ Kl	Cpr
MRSA	R	да	1	1(100%)	1(100%)	1(100%)	1(100%)	0(0%)
		не	4	4(100%)	4(100%)	4(100%)	3(75%)	3(75%)
	S	да	1	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	1(100%)
		не	4	0(0%)	0(0%)	0(0%)	1(25%)	0(0%)
	I	да	1	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)
		не	4	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	1(25%)
MSSA	R	да	20	18(94.74%)	1(5%)	1(5%)	0(0%)	1(7.69%)
		не	4	3(75%)	1(25%)	1(25%)	1(25%)	1(25%)
	S	да	20	1(5.26%)	19(95%)	19(95%)	19(100%)	2(15.38%)
		не	4	1(25%)	3(75%)	3(75%)	3(75%)	0(0%)
	I	да	20	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	10(76.92%)
		не	4	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	3(75%)

Pen-penicillin, cef-ceftioxin, flu-flucloxacillin, er-eritromicin, az-azitromicin, Kl-klaritromicin, cpr-ciprofloxacin

Табела 31. Приказ на антимикробна осетливост на Грам(+) бактерии во зависност од потенцијалот за создавање биофилм

	Аб	Присуство на биофилм	n	Gen	Kot	Kli	Rif/ Lin/ Van	Cf(zinforo)
MRSA	R	да	1	1(100%)	0(0%)	1(100%)	0(0%)	0(0%)
		не	4	3(75%)	1(25%)	3(75%)	0(0%)	0(0%)
	S	да	1	0(0%)	1(100%)	0(0%)	1(100%)	0(0%)
		не	4	1(25%)	3(75%)	1(25%)	4(100%)	0(0%)
	I	да	1	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)
		не	4	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)
MSSA	R	да	20	2(10%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)
		не	4	2(50%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)
	S	да	20	18(90%)	18(100%)	20(100%)	20(100%)	9(100%)
		не	4	2(50%)	4(100%)	4(100%)	4(100%)	1(100%)
	I	да	20	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)
		не	4	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)

Gen-gentamicin, kot-kotrimoxasole, kli-klindamicin, rif-rifampicin, lin-linezolid, van-vankomicin, cf-ceftaroline(zinforo)

На табелата 32 прикажана е антимикробната осетливост кај Грам(-) бактерии анализирани во зависност од потенцијалот за биофилм.

Изолатите на *Escherichia coli* со потенцијал за биофилм покажаа осетливост од 75% кон amoxicillin, amoxicillin-clavulonate, piperacillin-tazobactam, cefepime, ciprofloxacin и cotrimoxasole, наспроти 100% осетливост кон овие антибиотици на изолатите без потенцијал за биофилм. И двете групи на изолати имаа 100% сензитивност кон ertapenem, imipenem, meropenem, ceftazidime и amikacin.

Сензитивноста кон групата цефалоспорини (ceftazidime, ceftriaxone, cefepime), piperacillin-tazobactam, ertapenem, imipenem, meropenem, amikacin, ciprofloxacin беше 100% кај двете групи на изолати на *Proteus*. Изолатите со потенцијал за биофилм имаа резистентност од 50% кон amoxicillin-clavulonate, споредено со 100% резистентност кај изолатите без потенцијал за биофилм. Кон cotrimoxasole осетливи беа 60% од изолатите на *Proteus* со потенцијал за биофилм и 100% од изолатите без потенцијал за биофилм.

Кај сите изолати на *Enterococcus* во двете групи со и без потенцијал за биофилм осетливоста кон amoxicillin, amoxicillin-clavulonate, piperacillin-tazobactam, imipenem и meropenem беше 100%. Групата на изолати со потенцијал за биофилм за разлика од групата без потенцијал за биофилм покажа 17% резистентност кон ertapenem.

Во групата изолати со и без потенцијал за биофилм на *Pseudomonas aeruginosa* резистентност од 100% имаше кон amoxicillin, amoxicillin-clavulonate, cefuroxime, ceftriaxone, cotrimoxazole. Кон ertapenem изолатите со потенцијал за биофилм беа 100% резистентни, наспроти изолатите без потенцијал кои покажаа интермедиерна осетливост во 100%. Сензитивност од 28, % кон gentamicin покажаа изолатите со потенцијал за биофилм, а тие без потенцијал беа осетливи во 100%.

Изолатите на *Enterobacter* со и без потенцијал имаа 100% сензитивност кон ertapenem, imipenem, meropenem. Групата изолати без потенцијал беше осетлива 100% кон amoxicillin, amoxicillin-clavulonate, piperacillin-tazobactam, за разлика од изолатите со потенцијал кои имаа помал процент на сензитивност 75%. Сите изолати без потенцијал за биофилм беа осетливи кон amikacin и colistin, за разлика од оние со потенцијал кои покажаа осетливост во 93% и 50%.

Овие резултати покажуваат дека не постои разлика во осетливоста кон антимикробните средства помеѓу изолатите со и без потенцијал за биофилм.

Во однос на антимикробната осетливост на изолатите споредена in vitro и in vivo резултатите укажуваат дека после спроведување на антибиотски третман изолатите од контролните брисеви беа со понизок степен на создавање на биофилм (табела 8). Ова најверојатно се должи на фактот дека биофилмот со неговата специфична градба и структура е механичка бариера за антибиотиците и го оневозможува нивното дејство.

Табела 32. Приказ на антимикробна осетливост на Грам(-) бактерии во зависност од потенцијалот за создавање биофилм

	Аб	Присуство на биофилм	n	Amo	Amo-Cla	Pip-Taz	Ert	Imi	Mer
<i>Escherichia coli</i>	R	да	10	1(25%)	1(25%)	1(25%)	0(0%)	0	0
		не	2	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0	0
	S	да	10	3(75%)	3(75%)	3(75%)	10(100%)	9(100%)	4(100%)
		не	2	1(100%)	1(100%)	1(100%)	2(100%)	2(100%)	1(100%)
	I	да	10	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0	0
		не	2	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0	0
<i>Proteus</i>	R	да	5	5(100%)	2(50%)	0(0%)	0(0%)	0	0
		не	2	2(100%)	1(100%)	0(0%)	0(0%)	0	0
	S	да	5	0(0%)	2(50%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	4(100%)
		не	2	0(0%)	0(0%)	2(100%)	2(100%)	2(100%)	2(100%)
	I	да	5	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0	0
		не	2	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0	0
<i>Enterococcus</i>	R	да	6	0	0	0	1(17%)	0(0%)	0(0%)
		не	1	0	0	0	0	0(0%)	0(0%)
	S	да	6	6(100%)	6(100%)	6(100%)	5(83%)	10(100%)	10(100%)
		не	1	1(100%)	1(100%)	1(100%)	1(100%)	2(100%)	2(100%)
	I	да	6	0	0	0	0	0(0%)	0(0%)
		не	1	0	0	0	0	0(0%)	0(0%)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	да	11	5(100%)	5(100%)	2(20%)	7(100%)	1(11%)	0
		не	2	2(100%)	2(100%)	0	0	0	0
	S	да	11	0(0%)	0(0%)	0	0	0	9(100%)
		не	2	0(0%)	0(0%)	0	0	0	2(100%)
	I	да	11	0(0%)	0(0%)	8(80%)	0	8(89%)	0
		не	2	0(0%)	0(0%)	0	2(100%)	2(100%)	0
<i>Enterobacter</i>	R	да	15	1(25%)	1(25%)	1(25%)	0(0%)	0	0
		не	2	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0	0
	S	да	15	3(75%)	3(75%)	3(75%)	10(100%)	9(100%)	4(100%)
		не	2	1(100%)	1(100%)	1(100%)	2(100%)	2(100%)	1(100%)
	I	да	15	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0	0
		не	2	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0	0

Amo-amoxicillin, Amo cla-amoxicillin clavulonate, Pip taz-piperacilin tazobactam, Ert-ertapenem, Imi-imipenem, mer-meropenem

Табела 32. Приказ на антимикробна осетливост на Грам(-) бактерии во зависност од потенцијалот за создавање биофилм

	Аб	Присуство на биофилм	n	Cfr	Cft	Cfx	Cfp	Gen	Ami
<i>Escherichia coli</i>	R	да	10	1 (10%)	0	1 (50%)	1 (25%)	1 (10%)	0
		не	2	0	0	0	0	0	0
	S	да	10	0 (100%)	10 (100%)	1 (50%)	3 (75%)	9 (90%)	10 (100%)
		не	2	0 (100%)	2 (100%)	1 (100%)	1 (100%)	2 (100%)	2 (100%)
	I	да	10	9 (90%)	0	0	0	0	0
		не	2	2 (100%)	0	0	0	0	0
<i>Proteus</i>	R	да	5	2 (40%)	0	0	0	0	0
		не	2	1 (50%)	0	0	0	0	0
	S	да	5	0	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)
		не	2	0	2 (100%)	2 (100%)	2 (100%)	2 (100%)	2 (100%)
	I	да	5	3 (60%)	0	0	0	0	0
		не	2	1 (50%)	0	0	0	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	да	11	7 (100%)	2 (18%)	3 (100%)	2 (20%)	2 (28.57%)	1 (9%)
		не	2	2 (100%)	0	1 (100%)	0	0	0
	S	да	11	0	0	0	0	3 (42.85%)	10 (91%)
		не	2	0	0	0	0	1 (100%)	2 (100%)
	I	да	11	0	9 (82%)	0	8 (80%)	2 (28.57%)	0
		не	2	0	2 (100%)	0	2 (100%)	0	0
<i>Enterobacter</i>	R	да	15	9 (60%)	10 (67%)	10 (67%)	2 (14.28%)	10 (67%)	1 (7%)
		не	2	1 (50%)	1 (50%)	1 (50%)	0	2 (100%)	0
	S	да	15	5 (33%)	5 (33%)	5 (33%)	12 (85.71%)	5 (33%)	14 (93%)
		не	2	1 (50%)	1 (50%)	1 (50%)	2 (100%)	0	2 (100%)
	I	да	15	1 (7%)	0	0	0	0	0
		не	2	0(0%)	0	0	0	0	0

Cfr-cefuroxime, Cft-ceftazidime, Cfx-,ceftriaxone, Cfp-cefepime, gen-gentamicin, Ami-amikacin

Табела 32. Приказ на антимикробна осетливост на Грам(-) бактерии во зависност од потенцијалот за создавање биофилм

	Аб	Присуство на биофилм	n	Cpr	Kot	Col
<i>Escherichia coli</i>	R	да	10	1 (25%)	1 (25%)	0
		не	2	0	0	0
	S	да	10	3 (75%)	3 (75%)	0
		не	2	1 (100%)	1 (100%)	0
	I	да	10	0	0	0
		не	2	0	0	0
<i>Proteus</i>	R	да	5	0	2 (40%)	2 (100%)
		не	2	0	0	1 (100%)
	S	да	5	4 (100%)	3 (60%)	0
		не	2	1 (100%)	2 (100%)	0
	I	да	5	0	0	0
		не	2	0	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	да	11	0	7 (100%)	0
		не	2	0	2 (100%)	0
	S	да	11	0	0	1 (100%)
		не	2	0	0	0
	I	да	11	8 (100%)	0	0
		не	2	2 (100%)	0	0
<i>Enterobacter</i>	R	да	15	6 (40%)	10 (67%)	1 (50%)
		не	2	1 (50%)	2 (100%)	0
	S	да	15	9 (60%)	5 (33%)	1 (50%)
		не	2	1 (50%)	0	1 (100%)
	I	да	15	0	0	0
		не	2	0	0	0

Cpr-ciprofloxacin, Kot-kotrimoxazole, Col-colistin

5.4.2 Мултирезистентност на поедините специеси прикажана во зависност од потенцијалот за создавање биофилм

Мултирезистентноста или Multi Drug Resistance(MDR), дефинирана како резистентност кон еден или повеќе антибиотици од најмалку три различни групи на антибиотици беше присутна кај сите изолати на *MRSA*, *Acinetobacter*, *Corynebacterium*, *Serratia*, Недиференцирани Грам(-) бацили. Останатите изолати покажаа мултирезистентност кај 1/9(11.11%) од *Escherichia coli*, 2/22(9.09%) од *MSSA*, 7/13(69.23%) од *Pseudomonas aeruginosa*, 14/17(82.35%) од *Enterobacter*(табела 33).

Табела 33. Приказ на мултирезистентноста кај поедините специеси во зависност од потенцијалот за создавање биофилм

варијабла	n	MDR Multi drug resistance	Потенцијал за биофилм				
			да				не
			вк	слаб	умерен	силен	
<i>MRSA</i>	5	5(100%)	1			1	4
<i>Escherichia coli</i>	9	1(11.11%)	1			1	
<i>MSSA</i>	22	2(9,09%)					2
<i>Proteus vulgaris</i>	7	0(0%)					
<i>Enterococcus</i>	7	0(0%)					
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13	7(69,23%)	7	1	2	4	2
<i>Enterobacter</i>	17	14(82,35%)	12	3	3	6	2
<i>Acinetobacter</i>	1	1(100%)	1	1			
<i>Stenotrophomonas</i>	4	0(0%)					
<i>Corynebacterium</i>	3	3(100%)	3			3	
<i>Serratia</i>	4	4(100%)	1	1			3
Недиференцирани Грам(-) бацили	1	1(100%)	1			1	
<i>Achromobacter</i>	1	0(0%)					

6.0 ДИСКУСИЈА

6.1 Хроничните рани - социјален и економски товар на општеството

Хроничните рани се многу тешки и скапи за лекување, и затоа постои итна потреба за развој на поефективни терапевтски методи кои ќе ги обноват процесите на заздравување. Продолженото заздравување на раните може да предизвика значајни проблеми за лица со ограничена мобилност, постарите лица, како и за оние кои живеат со коморбидитети како што се дијабетес, кардиоваскуларни болести и карциноми. Ова продолжено заздравување го зголемува ризикот од инфекција кај пациентите. Продолжената активација на вродениот имунолошки систем и воспаление се вообичаени карактеристики кои се забележуваат кај повеќето видови хронични рани. Сепак, факторите кои ја поттикнуваат оваа активација остануваат делумно неразбрани. Нова појава на докази сугерира дека составот и структурата на микробиомот на раната може да имаат централна улога во поттикнувањето на оваа дисрегулирана активација, но клеточните и молекуларните механизми кои стојат зад овие процеси бараат понатамошно истражување.

Хроничните рани претставуваат значителен човечки и економски товар и на индивидуално и на општествено ниво, со релативно лош квалитет на живот поврзан со здравјето генерално, значителни трошоци поврзани со нивното лекување и со трендот на раст на истите кој произлегува од стареењето на популацијата и побрзото развивање на асоцирани хронични болести, како што е дијабетесот [237]. Проценка од релативно големо истражување, базирано на база на податоци од записи од пациенти, сугерира дека преваленцата на хронични рани во Велс била 6% во 2012–13, со трошоци кои одговараат на 5,5% од вкупните трошоци на NHS [238].

Во 2014 година, хроничните рани влијаеле на 14,5% од корисниците на Medicare во САД, но оваа бројка се зголемила на 16,3% до 2019 година. Групата на корисници на Medicare која била најпогодена во однос на преваленцата на хронични рани во текот на петгодишниот период биле оние на возраст помала од 65 години (мажи: 12,5% до 16,3%; жени: 13,4% до 17,5%). Во текот на петгодишниот период, забележано е намалување на трошоците поврзани со хронични рани (29,7 милијарди долари во 2014 година до 22,5 милијарди долари во

2019 година) кое се должи на третман на раните и тоа во случајов конзервативен [239].

Поради фактот што хроничните рани се огромен економски и социјален проблем, направени се многубројни студии за проценка на нивната преваленца и категории на хронични рани. Тие информации се клучни за формирање агенда и планирање на цели за справување со овој проблем, особено бидејќи зголемениот број на постари лица и зголемувањето на преваленцата на асоцирани коморбидитети дополнително го зголемуваат ризикот од хронични рани.

6.2 Анализа на основните карактеристики на пациентите

Во ретроспективна анализа на податоци добиени од амбулантски центар за рани и Австриското здравствено осигурување, истражувана е популација која се состоела од лица кои живееле во Австрија и биле покриени со задолжително здравствено осигурување во период од 2018 до 2022 година [240]. Извршена била дескриптивна, социо-демографска анализа на податоците за пациентите и резултатите покажале дека полот бил речиси еднакво распределен ($n = 4963$; 49.6% жени). Распределбата по возраст покажала дека групата од 71-80 години била најголемата група. Од пациентите со хронични рани 31% имале дијабетес како основна болест. Заклучокот бил дека пациентите со хронични рани се карактеризираат со постара возраст и мулти-морбидитет [240].

Kuikko et al. во студијата што ја спровеле во Центарот за рани на Универзитетската болница во Тампере, во Финска, вклучиле 946 пациенти во период од 6 јуни 2018 до 31 март 2021 година [241]. Во оваа студија анализирале карактеристики на хроничните рани според пол и етиологија. Средната возраст на пациентите со хронични рани при нивната прва посета била 72 години (опсег 14–99), а 457(48%) биле жени. Најчестите придружни болести кај пациентите со хронични рани биле хипертензија(73,3%), дијабетес(49,8%), хиперхолестеролемија (40,1%) и дебелина(39,6%) [241]. Во оваа студија преовладуваат мажи, што е во спротивност со повеќето [242-245], но не со сите претходни студии [246].

Студијата на Морат и соработниците имала за цел да ги опише преваленцата и клиничките карактеристики на пациентите во одделот за нега на рани, болница

Туанку Фаузија, Малезија, и факторите поврзани со хронични рани кај пациентите [247]. Била извршена ретроспективна анализа на секундарни податоци од 254 пациенти кои се прегледани и лекувани од јануари до декември 2022 година. Биле пронајдени значајни асоцијации помеѓу хронични рани кај пациенти кои имале цереброваскуларно пореметување ($P=0.012$) и почетната големина на раната ($P=0.029$). Преваленцата на хронични рани била 77.6%. Застапеноста според пол била во корист на машкиот пол 53,9%, споредено со женски пол 46,9% [247].

Во нашата студија беа вклучени вкупно 100 пациенти, 33 пациенти со хронични рани без изолат и 67 пациенти со хронични рани со изолат. Истите беа анализирани според број на рани, имајќи го предвид фактот што кај некои пациенти имаше повеќе од 1 хронична рана која беше од наш интерес. Беа анализирани вкупно 106 рани. Половата структура на пациентите ја сочинуваа 51% машки пациенти и 49% пациенти од женски род, што се совпаѓа со податоците од студиите на Morasek и Kuikko [241], при што распределбата на полот е речиси изедначена или со мала предност на мажите. Студијата на Morat et al. од Малезија исто така покажала мала предност на мажите [247]. Средната возраст на пациентите во нашето истражување е пониска 63,9 години во споредба со 72 години во студијата на Kuikko et al., но оваа разлика може да биде поврзана со различните популации и здравствени карактеристики на пациентите. Кај сите студии е забележана висока стапка на дијабетес и хипертензија кај пациентите со хронични рани, што укажува на важноста на управувањето со овие состојби во третманот на хронични рани. Во студиите на Kuikko и Morat се нагласува поврзаноста помеѓу метаболичките заболувања и раните, а исто така во нашето истражување и во студијата на Morasek се забележува присуството на мулти морбидитет [241,247]. Резултатите од нашата студија покажуваат дека најчестите коморбидитети се во прилог на хипертензија кај 59%, хиперлипидемија 26% и дијабетес мелитус кај 23% од пациентите, што корелира со податоците од студијата на Kuikko и соработниците во која хипертензија имале 73,3%, дијабетес мелитус 49,8% и хиперхолестеремемија 40,1% од пациентите [241]. Резултатите од нашето истражување се генерално слични на оние од претходните студии, особено во поглед на полот, присуството на коморбидитети и староста на пациентите. Сепак, разликите во просечната возраст

и распоредот на различни метаболички заболувања покажуваат значајни варијации меѓу различните популации. Фактот дека пациентите почесто имаат метаболички заболувања, како што се дијабетес, хиперхолестеролемија, ја нагласува потребата од соодветна избалансирана исхрана и упатства за начин на живот.

6.3 Микробиологија на хроничните рани

Нормално, кожата и слузокожата кај луѓето содржат различни групи микроорганизми кои може да се поделат на две главни групи, вклучувајќи ја резидентната флора, која се состои од релативно фиксни типови на микроорганизми и транзитната флора која се состои од непатогени или потенцијално патогени микроорганизми кои населуваат кожа или слузокожа во период од неколку часа до недели. Инфекцијата на рани игра важна улога во развојот на хроничитетот, забавувајќи го процесот на заздравување на раните.

Студијата на Беса спроведена во Италија имала за цел да ги идентификува бактериските патогени присутни во инфицираните рани и да го карактеризира нивниот профил на резистенција на најчестите антибиотици кои се користат во терапијата [248]. Триста и дванаесет брисеви од рани биле собрани од 213 пациенти и анализирани за идентификација на микроорганизми и за определување на нивната антибактериска осетливост. Пациентите со различни типови рани биле вклучени во оваа ретроспективна студија, спроведена од март до септември 2012 година. Вкупно 28 видови биле изолирани од 217 инфицирани рани [248]. Најчестиот бактериски вид кој бил детектиран бил *Staphylococcus aureus* (37%), следен од *Pseudomonas aeruginosa* (17%), *Proteus mirabilis* (10%), *Escherichia coli* (6%) и *Corynebacterium spp.* (5%). *Staphylococcus aureus* бил исто така пријавен во многу други студии во Европа како доминантен микроорганизам (40–60% од вкупниот број микроорганизми) изолиран од различни типови рани [249-254]. *Pseudomonas aeruginosa* исто така како најчесто детектиран грам-негативен микроорганизам, е прикажан во други истражувања на истата територија [251, 252, 255, 256, 257]. Полимикробна инфекција во студијата на Беса била пронајдена во 59 (27,1%) од примероците и била главно составена од два видови на патогени бактерии. Најчестата асоцијација била *S.aureus/ P. aeruginosa* [248].

Во нашата студија беа вклучени вкупно 100 пациенти, од кои беа анализирани изолати од вкупно 106 рани, од кои 67 беа со изолат. Во оваа група на анализирани хронични рани, најчесто беа изолирани следните бактерии *MSSA* (35.82%), *Pseudomonas aeruginosa* (19.4%) и *Enterobacter* (19,4%) со иста застапеност и *Escherichia coli* (17.91%). Слична хетерогеност во однос на најчесто застапените бактерии покажуваат последните истражувања на бактериската разновидност кај германски пациенти со хронични рани на нозете каде *S.aureus* се наоѓа во 50% од случаите, *P. aeruginosa* и *Enterobacter* во 30% од случаите [258].

Резултатите покажаа дека 29,8% од примероците се со полимикробна природа, што корелира со резултатите од студијата на Беса во која 27,1% биле со најмалку два видови на патогени бактерии [258]. Зачестеноста на полибактериските видови (55%) била повисока од онаа на монобактериските видови (45%) во студијата на Ahmed и соработниците [259], што се разликува од наодите на Hassan et al. [260], кои пријавиле повисока зачестеност на монобактериски изолации со 60% и 40% за полибактериски видови. Слично на тоа, Asres и сор. [261] и Bessa и сор. [248] пријавиле преовладување на мономикробни инфекции во однос на полимикробни инфекции со стапки од 88,6% и 72,8%, соодветно како во нашата студија. Присуството на мономикробни или полимикробни заедници на бактерии има повеќекратна природа. На пример, состојбата на раната, микробактериската густина, претходното лекување на раната, дермалната влажност и достапноста на хранливи состојки може да ја објаснат разликата [262].

Како и во ретроспективната студија на Руса и соработниците спроведена во Италија [263], така и нашите резултати покажаа дека најчеста комбинација во делот на полимикробноста прават *MSSA* и *Pseudomonas aeruginosa* (10%), со иста процентуална застапеност на *MSSA* и *Enterobacter* (10%), што најверојатно се должи на подеднаквата застапеност на *Pseudomonas aeruginosa* и *Enterobacter*. Последново може да се објасни со фактот дека во нашиот случај доминираат грам негативните (59,7%) во однос на грам позитивните бактерии (40,2%), што е случај и со резултатите на Руса и соработниците каде грам негативните бактерии биле позастапени (57,9%) во однос на грам позитивните (36,6%) [263], потврдувајќи ги резултатите пријавени и во други студии [264-267]. Наодите во студијата на Cavallo

[268] откриле речиси слични пропорции на грам-позитивни бактерии (48,3%) и грам-негативни видови (51,7%).

Присуството на полимикробни инфекции ја прави ерадикацијата на микроорганизмите покомплицирана. Полимикробната природа на хроничните рани најверојатно обезбедува соодветна средина за хоризонтален генски трансфер помеѓу микроорганизмите што е причина за отежнат и отпорен третман[269].

Ховел Џонс и соработниците ја анализираше микробиологијата на хроничните рани преку податоци добиени од ретроспективни и проспективни студии спроведени во Англија. Извештаите за *S. aureus* покажале присуство во различни фреквенции, од 43% кај инфицирани рани на долни екстремитети до 88% кај неинфицирани рани. *Pseudomonas aeruginosa* бил уште еден често идентификуван организам и бил пронајден во 7–33% од раните [269].

Во студијата спроведена во болнички услови во Хаваса, Етиопија од Сахле и соработниците утврдена е преваленца на *S. aureus* во хроничните рани која изнесувала 23,2% [270]. Оваа преваленца била пониска од онаа која е пријавена во други истражувања спроведени во Велика Британија и Италија[268,269].

Во нашето истражување застапеноста на *MSSA* како најчест патоген изолиран од хроничните рани е 35,82%, а преваленцата на *MRSA* е 7,46% слично на резултатите од студијата на Сахле и Ховел Џонс и сор.[269,270]. Нашите резултати се во согласност со резултатите од студиите спроведени во Етиопија од страна на Kulayta и соработниците како и студии сработени на територијата на Европа и САД, каде застапеноста на *S. aureus* била 38,3% односно 38,09% и 32,1% [271-273]. Резултатите покажуваат преовладување на *S. aureus* кое може да биде поврзано со веројатен пренос на патогени од нормалната флора на пациентите или дури и здравствените работници и околните недезинфицирани предмети[274].

Набљудуваните варијации во преваленцата можат да се припишат на разлики во методологијата која била користена во истражувањата или на разлики во сериозноста на случаите во соодветните подрачја на истражувањата.

Во студијата на Sahle, преваленцата на *MRSA* била пронајдена дека изнесува 8,8%, што е пониско од стапките пријавени во различни региони на Европа. Една ретроспективна студија спроведена во клиника во Обединетото Кралство покажала дека *MRSA* бил изолиран кај 15,2% од DFU [275], а три години подоцна таа стапка речиси се удвоила [276]. Во Шпанија, кај хоспитализирани пациенти со DFU (diabetic foot ulcers), застапеноста на *MRSA* изнесувала 5,3% [277], додека шест години подоцна достигнала 12,0% [278]. Слични резултати, преваленца од 11,7% биле регистрирани и во мултицентрична студија во САД [279]. Понови податоци од Франција покажале изолат на *MRSA* во 19,7% од случаите со DFU [280], додека други извори од истата земја пријавиле слична застапеност од 16,0% [281].

Преваленцата на *MRSA* значително варира меѓу земјите (15–30%), што може да се припише на географските разлики, разликите во практиките за превенција на инфекции, големината на примерокот или периодите на истражување кои се користени во соодветните истражувања како и различните методи на дијагностика и изолација. Без оглед на пониската стапка во ова истражување, *MRSA* останува сериозен проблем поради својата зависност од лекови од втор ред кои се повеќе токсични и скапи, што може да доведе до понатамошен развој на отпорност на лекови [282]. Користењето на ванкомицин за третман на *MRSA* дури доведе до развој на ванкомицин-отпорен *S.aureus*(*VRSA*)[283]. Друга алармантна карактеристика на *MRSA* е неговата способност да предизвика како болнички (нозокомијални) инфекции, така и да се прошири во заедницата, влијаејќи на индивидуи без претходен контакт со болничкото опкружување [284]. Економскиот импакт на *MRSA* може да биде значителен, што се манифестира со продолжени болнички престои за пациентите кои се погодени [285].

Во студијата на Kulayta, вториот најчесто изолиран патоген во хроничните рани бил *Pseudomonas aeruginosa* со застапеност 16,4%, што се совпаѓа со резултатите од нашата студија и студиите на Cavalo и Serra со соработниците спроведени во Италија со 25% и 12,7%, и се смета за опасен бидејќи се наоѓа во длабоките дермални ткива; подрачјето на рани инфицирани со овој бактериски патоген, генерално, е широко распространето [268, 271, 272]. Исто така, *P. aeruginosa* е

познат по формирањето на биофилмови, оштетување на ткивата и широко распространета резистенција на повеќе антибиотици и дезинфекциони средства.

Во прегледот на достапната литература на студии кои ја опишуваат микробиолошката структура на хронични инфекции на рани во различни европски земји се утврдува дека медијалната стапка на изолација на *P. aeruginosa* кај хроничните рани во Европа изнесува 23%. Од друга страна во студии спроведени во САД, *Pseudomonas aeruginosa* бил втор најчесто изолиран микроорганизам, со опсег на детекција од 4,5% до 28%, а медијалната вредност изнесувала приближно 15%. Оваа статистичка констатација ја потенцира улогата на *P. aeruginosa* како значаен причинител на комплицирани и полирезистентни инфекции, особено во услови на хронични и тешко заздравувачки рани[286].

Во однос на застапеноста и доминацијата на поедини бактериски видови кај грам негативните бактерии, студијата на Ahmed спроведена во Египет, потврдува дека меѓу сите изолати, *P. aeruginosa* бил вториот најчест патоген изолиран од рани, со зачестеност од 40% [259]. Оваа зачестеност била компатибилна со онаа забележана од Manikandan и Amsath [287]. Втора по зачестеност присутна грам негативна бактерија била *Klebsiella spp.* (11,6%), и после неа *Proteus spp.* (10%) и *E. coli* (6,7%). Претходна студија во Египет открила преовладување на *Klebsiella spp.* следено од *E. coli* [288]. Друга студија покажала доминација на *E. coli* меѓу сите идентификувани грам-негативни видови, следено од *Proteus spp.*, со најмала зачестеност на *P. aeruginosa* [289]. Во Кина спроведена студија од Guan et al. покажува најчеста застапеност на *E. coli* (11,5%), после која следат *Pseudomonas aeruginosa* (11,0%), *Proteus mirabilis* (8,0%) и *Klebsiella pneumoniae* (6,7%) [290]. Овие резултати се во согласност со студијата на Calina и соработниците во Романија, која се фокусирала на инфекции на хируршки рани[291].

Во нашата студија од грам негативните бактерии доминира присуството на *Pseudomonas aeruginosa* и *Enterobacter*, со застапеност од 19,4 % и кај двата видови бактерии. Ова корелира со резултатите од студијата на Kulayta и Cavalo со соработниците. Разновидноста помеѓу различните студии може да се припише на

бројот на учесници, факторите на животната средина, здравствените услуги и индивидуалните здравствени услови.

Табела 34. Компаративна табела за микробиологија на рани

Студија	Земја/тип на студија	Најчести патогени % (застапеност)	Полимикробна инфекција (%)	Доминација според Грам бојење
Bessa et al.	Италија/ ретроспективна	<i>MSSA</i> (37%), <i>P. aeruginosa</i> (17%), <i>P. mirabilis</i> (10%), <i>E. coli</i> (6%), <i>Corynebacterium spp.</i> (5%)	27.1%	Грам(-) 55,8%
Howell-Jones et al.	Англија/ Мета анализа	<i>S. aureus</i> (<i>MSSA</i> + <i>MRSA</i>) (43–88%), <i>P. aeruginosa</i> (7–33%)	/	/
Sahle et al.	Етиопија/cross секциска	<i>MSSA</i> (23.2%), <i>MRSA</i> (8.8%)	/	/
Cavalo et al.	Италија/мета анализа	<i>S. aureus</i> (<i>MSSA</i> + <i>MRSA</i>)(48.3%), <i>P. aeruginosa</i> (25%), <i>Enterobacter spp.</i>	/	Грам(-) (51.7%)
Ahmed et al.	Египет/ дескриптивна, cross секциска	<i>P. aeruginosa</i> (40%), <i>Klebsiella spp.</i> (11.6%), <i>Proteus spp.</i> (10%), <i>E. coli</i> (6.7%)	55%	Грам(-) 48,2%
Guan et al.	Кина/ ретропективна	<i>S. aureus</i> (<i>MSSA</i> + <i>MRSA</i>) (29.2%), <i>Escherichia coli</i> (11.5%), <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (11.0%), <i>Proteus mirabilis</i> (8.0%), and <i>Klebsiella pneumoniae</i> (5.8%)	13,4%	Грам(-) 51,3%
Telenta	Македонија/ проспективна	<i>MSSA</i> (35.82%), <i>P. aeruginosa</i> (19.4%), <i>Enterobacter</i> (19.4%), <i>E. coli</i> (17.91%)	29.8%	Грам(-) (59.7%)

6.4 Присуство на биофилм во хроничните рани и потенцијал за создавање кај поедините изолати

Хроничните рани покажуваат значителна разновидност на бактериски видови, но не е јасно како овие разлики придонесуваат за хроничноста. Едно од можните објаснувања е дека овие бактерии формираат цврсти биофилмови, кои ги вметнуваат бактериските клетки во самопродуцирана полимерна матрица, што ги штити од имунолошките реакции на домаќинот и од антибиотиците. Оваа структура нуди бројни предности за заедницата, како што се метаболичка соработка, пасивна отпорност и хоризонтален пренос на гени [292]. Исто така, е покажано дека ги нарушува процесите на заздравување на ткивата и промовира воспалителен одговор [292]. Биофилмовите се сложени и разновидни структури кои можат да бидат составени од единечни видови или да бидат полимикробни. Тие

се до 1.000 пати поотпорни на антимикробни агенси и дезинфекциони средства од планктонските клетки. Покрај тоа, имунолошкиот систем често е неефикасен во борбата против инфекции поврзани со биофилмови. Неколку фактори придонесуваат за зголемената отпорност на биофилмовите, вклучувајќи ниски стапки на раст, висока густина на клетки, присуство на клетки-преживувачи, градиенти на хранливи состојки и кислород, хоризонтален пренос на гени, пумпи за излучување и високи стапки на мутација. Присуството на матрицата на ЕПС (екстрацелуларни полимерски супстанции) се смета и за физичка бариера против антимикробни агенси и имунолошки реакции на домаќинот, бидејќи ја намалува дифузијата на лекови, антитела и имунолошки клетки во биофилмот [292].

Студии од Непал и Египет забележале присуство на 65.1% и 70.1% производители на биофилмови, соодветно, што ја истакнува улогата на биофилмовите во патогенезата на микробните инфекции на рани и предизвиците поврзани со поставувањето на режимите за лекување и можна упорност на инфекциите [293, 294].

Преваленцата на бактерии способни да продуцираат биофилм опишана во некои од претходно спроведени студии во Италија била дури и поголема 80,5% [295]. Сличен тренд на формирање биофилм бил исто така забележан во мета анализата на Малоне 78,2% [296]. Овие податоци се во согласност со претходни извештаи од Монтана, Вашингтон и Данска, во кои се опишуваат проценти на бактерии што продуцираат биофилм помеѓу 60% и 90% кај хроничните рани [297-301].

Утврдено е во студијата на Kulayta и соработниците дека 65.2% (47/72) од изолатите на *S. aureus*, 67.7% (21/31) од *P. aeruginosa* и 68.4% (13/19) од *K. pneumoniae* биле производители на биофилм [271]. Утврдено било дека производството на биофилм е поврзано со некои од мултирезистентните соеви и тие вклучуваат MRSA и ESBL-продуцирачки грам-негативни соеви [302]. Овие резултати сугерираат дека формирањето на биофилм може да биде главната сила зад влошувањето на мултирезистентноста во инфекциите на рани, до илјада пати. Мрежата на биофилмот составена од EPS дејствува како бариера која го

оноевозможува процесот на дифузија, ограничувајќи го движењето на антибиотиците до внатрешноста или дури и реагирајќи со молекулите на лековите. Ова овозможува ефикасно хоризонтално пренесување на гени за резистенција меѓу бактериите во матрицата на биофилмот, што доведува до ширење на маркерите на резистенција на лекови и други фактори на вирулентност.

Во студија спроведена во Пешавар, Пакистан потенцијал за формирање биофилм покажале сите изолати на *MRSA* или 100%, потоа *Escherichia coli* (81,8%), *Enterococcus faecalis* (80%), *Pseudomonas aeruginosa* (79,5%), *Klebsiella pneumoniae* (75,6%), *Serratia marcescens* (75%), *Bacillus spp.* (71,4%), *Streptococcus spp.* (71,4%), *Enterobacter* (60%) и *Staphylococcus spp.* (50%) [303]. Во контекст на овие наоди, претходна студија од Пакистан, изведена од Hassan et al, забележала 37,1% *Staphylococcus epidermidis*, 27,1% *Escherichia coli*, 15,7% *Klebsiella pneumoniae*, 11,4% *Staphylococcus aureus*, 4,2% *Enterococcus faecalis* и 4,2% *Pseudomonas aeruginosa* како бактерии продуценти на биофилмови во хронични инфекции на рани[304]. Од друга страна пак во студијата на Di Domenico спроведена во Рим, Италија профилирањето на биофилмот на ниво на поединечни бактериски видови покажало дека 94,6% од изолатите на *Staphylococcus aureus*, 73,7% од соевите на *Pseudomonas aeruginosa*, 60,0% од ESBL-соевите на *Klebsiella pneumoniae*, 58,3% од соевите на *Acinetobacter baumannii* и 53,3% од изолатите на *Escherichia coli* биле со способност за создавање биофилм [295].

Во нашата студија од вкупно анализирани 88 бактериски изолати од прв брис кај пациенти со хронични рани, потенцијал за биофилм покажаа 63 (71,59%). Ова корелира со мета анализата на Малоне и студиите спроведени во Непал и Египет [290, 291, 294]. Биофилм продуцирачки беа *MSSA* 81,81%, *Pseudomonas aeruginosa* 84,61%, *Enterobacter* 92,3%, *MRSA* 20%, *Escherichia coli* 44,44%, *Proteus* 66,66%, *Enterococcus* 80%, *Acinetobacter* 100%, *Stenotrophomonas maltophilia* 33,3%, *Corynebacterium gr* 100%, *Serratia* 0%, *Nediferencirani gr- bacilli* 100% и *Achromobacter denitrificans* 100%.

И мулти резистентноста на антибиотици и формирањето биофилм можат да доведат до потешкотии во лекувањето на инфекции каде *P. aeruginosa* е етиолошки

фактор. Истражувањето на Ratajczak et al. во Полска покажало дека сите изолати на *P. aeruginosa* изолирани од клинички примероци биле способни да формираат биофилм под ин витро услови[305]. Меѓутоа, тие се разликувале по степенот на формирање на биофилм. Најголем број изолати покажале силна способност за формирање биофилм (74,0%), додека значително помалку изолати покажале умерен (16,4%) и слаб (9,6%) потенцијал за формирање биофилм. Слични наоди биле пријавени и од други автори [306-308]. Студиите спроведени во 2018 година од Ј. Лима и соработниците [307] за проценка на способноста за формирање биофилм покажале дека 77,5% од клиничките изолати на *P. aeruginosa* биле способни да произведуваат биофилм. Да Силва Карвало и соработниците [308] откриле дека 86,5% од изолатите на *P. aeruginosa* биле класифицирани како силни или умерени производители на биофилм.

Во студијата на Kamali и соработниците, фенотиповите на биофилм на *P.aeruginosa* сочинувале 83,75% (n = 67), распределени во следните категории: 16,25% (n = 13) произведувале силен биофилм; 33,75% (n = 27) произведувале умерен биофилм; 33,75% (n = 27) произведувале слаб биофилм, додека 16,25% од изолатите (n = 13) биле идентификувани како без потенцијал за создавање на биофилм[309].

Во истражувањето на Chimi и соработниците, 100% од изолатите на *P. aeruginosa* од инфицирани рани биле производители на биофилм, од кои 50%, 37% и 13% биле силни, умерени и слаби производители на биофилм, соодветно [310]. Овие податоци ја потврдуваат улогата на биофилмовите во заздравувањето на рани, бидејќи бактерискиот биофилм е препознаен како главен фактор за одложено заздравување на рани, а високи нивоа на продукција на биофилм повторно биле опишани кај мултирезистентните организми [310]. Овие резултати се слични на оние на Џабаламели и соработниците, кои покажале дека 96% од *P. aeruginosa* изолирани од рани биле производители на биофилм, од кои 49,9% биле силни производители на биофилм, 26% биле умерени производители на биофилм и 22,9% биле слаби производители на биофилм [311]. Оваа способност за формирање биофилм би можела да биде резултат на различни компоненти кои играат улога во прикачувањето на *P. aeruginosa* на површини. Овие компоненти вклучуваат

флагели, тип IV пили, Cup фимбрија, екстрацелуларна ДНК (eDNA) и Псл полисахариди [312]. Оваа способност за формирање биофилм исто така би била резултат на ослободувањето на соединенија како железни сидерофори, биосурфактанти и EPS во нивната околина.

Во студијата на Васиљевич спроведена во Србија пријавено е дека од вкупно 163 клинички изолати на *Pseudomonas aeruginosa* најголемиот дел 39,26% биле силни продуценти на биофилм, 34,36% од изолатите биле умерени продуценти, додека само 2,45% не формирале биофилм[313]. Наспроти оваа студија, во студијата на Милојкович во Јужна Србија поголемиот дел од изолатите 77,66% покажале одредена способност за формирање биофилм и тоа умерена способност 39,73% и претежно слаба 53,42% од изолатите [314].

Во нашата студија од вкупно изолирани 19,4% на *Pseudomonas aeruginosa* изолати, потенцијал за создавање биофилм покажаа 84,61% и тоа со силен потенцијал за биофилм имаше 63% од изолатите, умерен потенцијал 26,31% и со слаб потенцијал беа 5,26% од изолатите. Овие резултати корелираат со резултатите добиени од студијата на Chimi et al. [310].

Од друга страна пак изолатите на *MSSA* покажаа потенцијал за создавање биофилм во 81,8% и тоа 34% беа со силен, 14,2% со умерен и 37% со слаб потенцијал за создавање биофилм. Овие резултати се разликуваат од достапните во литературата како што е студијата на Руја и соработниците и Banerje и соработниците каде силен потенцијал покажале 4 (8%), 10 (20%) биле со умерен, 20 (40%) со слаб потенцијал за создавање биофилм, односно 5 (7.5%) биле силни производители на биофилм, 26 (38.8%) биле умерени, а 18 (26.8%) слаби производители на биофилм[315, 316]. Ова најверојатно се должи на различниите механизми за создавање биофилм, различните експресирани гени и сето тоа зависно од индивидуалните карактеристики на пациентите и географската дистрибуција на спроведените истражувања со различни здравствени услуги и системи. Овие широки варијации во преваленцата може да се припишат на нееднаквоста во големината на примерокот, периодот на истражување, демографските карактеристики на учесниците, регионот,

применетите техники за откривање на биофилмови и видот на изолираните бактерии.

После *MSSA* и *P.aeruginosa*, *Enterobacter* е третата најзастапена бактерија во изолатите. Оваа бактерија покажа потенцијал за создавање биофилм во 92,3% и тоа со силен потенцијал беа 50% од изолатите, а со умерен и слаб потенцијал беа по 25% од изолатите. Овие резултати корелираат со наодот во студијата на Swarna и соработниците каде силен потенцијал за биофилм покажале 66,6%, а слаб 33,3% [317].

Табела 35. Компаративна табела за потенцијал за создавање биофилм

Изолат	Нашата студија – % на продукција	Силен	Умерен	Слаб	Други студии (%) на продукција
<i>P. aeruginosa</i>	84.61%	63%	26.31%	5.26%	1.100% – Chimi et al. [74] (50% силен, 37% умерен, 13% слаб) 2. 96% – Џабаламели [75] (49.9% силен, 26% умерен, 22.9% слаб) 3. 83.75% – Kamali et al. [73] (16.25% силен, 33.75% умерен, 33.75% слаб) 4.Vasiljevic [77] :39,26% силен, 34,36% умерен, 23,93% слаб
<i>MSSA</i>	81.81%	34%	14.2%	37%	1.69,8%-Puja et al.[79]: 8% силен, 20% умерен, 40% слаб 2. 73,8%-Banerje et al.[80]: 7.5% силен, 38.8% умерен, 26.8% слаб
<i>Enterobacter spp.</i>	92.3%	50%	25%	25%	100%-Swarna et al. [81]: 66.6% силен, 33.3% слаб

6.5 Антимикробна осетливост/резистентност кај изолатите од хроничните рани

Антибиотската отпорност (AMR), глобален здравствен предизвик кој влијае на луѓето ширум светот, предизвикува значителни потешкотии во третманот на болестите [82]. Резултатите од нашата студија покажаа речиси идентични вредности во однос на антибиотската осетливост, односно резистентност со студијата на Sahle и соработниците. *Staphylococcus aureus* покажа висока

резистентност кон пеницилин дури 91,3%, што е речиси идентично со 91,2% кај Sahle и соработниците[269]. Овој наод е во согласност со резултатите од студијата на Budzynska и соработниците каде пеницилин резистентноста достигнала 86% [319]. Сепак, овој процент покажува малку повисока стапка на отпорност во споредба со стапките пријавени од Kahsay и соработниците [320] и Tsige и соработниците [321]. Напротив, сите изолати на *MSSA* во нашето истражување покажаа 100% осетливост на линезолид исто како и во студијата на Sahle и Budzynska. Високата отпорност на пеницилин ја истакнува потребата од разумно користење на антибиотици и континуирано следење на шемите на отпорност за да се води ефикасен третман. Од друга страна, 100% осетливоста на *MSSA* на линезолид е клинички значајна, што го прави ефикасен третман, особено во случаи на отпорност на антибиотици. Третманот со линезолид има предност, а тоа е можноста пациентите да ја примаат оваа терапија во форма на перорални таблети во домашни услови, споредено со ванкомицинот кој е во форма на интравенски р-р и неопходно е да се ординира во болнички услови. Ова ја истакнува потенцијалната употреба на линезолид како сигурен антимикуробен агенс, што придонесува за успешни исходи на третманот и подобрена грижа за пациентите со инфекции на *S. aureus*. Сепак, важно е да останеме внимателни во зачувувањето на ефикасноста на линезолидот и други антибиотици преку промоција на соодветна употреба и спроведување мерки за контрола на инфекции.

Што се однесува до *MRSA*, тестирањето за антимикуробна осетливост откри дека сите изолати на *MRSA* беа осетливи на ванкомицин. Овој наод е во согласност со студијата спроведена во САД [279] која исто така пријавила 100% осетливост на ванкомицин. Сепак, во студијата на Horne, во Германија пријавена е стапка на отпорност на ванкомицин приближно 50% [322]. Пријавената осетливост на ванкомицин во нашето истражување е охрабрувачка. Сепак, клучно е да останеме внимателни во следењето на шемите на осетливост на *MRSA* за да се обезбеди постојаната ефикасност на овој критичен антибиотик.

Осетливоста кон останатите групи антибиотици во нашата студија беше следнава: кон cefoxitin, flucloxacillin, ceftriaxone и cefotaxime беа отпорни сите бактериски изолати на *MRSA* и само 2 (2.98%) изолати на *MSSA*. Наодот од

антибиограмот, бактериите од видот *MSSA* најчесто ги презентираше како осетливи кон овие антибиотици поточно 22(91.67%). Од 5 изолати на *MRSA* 1(20%) беше осетлив, останатите 4(80%) изолати беа отпорни кон *eritromycin*, *azithromycin* и *klaritromycin*. Од 23 изолати на *MSSA* испитувани кон *eritromycin*, *azithromycin* и *klaritromycin*, 22 (95.65%) беа осетливи.

Кон *ciprofloxacin* 1(20%) изолат на *MRSA* беше осетлив, 3(20%) изолати беа отпорни, 1(20%) изолат беше со интермедиерна осетливост. Од 17 изолати на *MSSA* чија осетливост беше испитувана кон *ciprofloxacin*, 2 (11.76%) изолати беа осетливи, исто толку изолати беа отпорни, 13(76.47%) покажуваа интермедиерна осетливост кон *ciprofloxacin*. Изолатите на *MRSA* кон *gentamycin* најчесто беа отпорни – 4/5 (80%), осетлив беше 1(20%) изолат. Изолатите на *MSSA* кон *gentamycin* најчесто беа осетливи – 20/24 (83.33%), останатите 4 изолати на оваа бактерија кон овој антибиотик презентираа отпорност. Кон *kotrimoxazole* беа осетливи 4/5(80%) бактерии од видот *MRSA* и сите изолати на *MSSA*. Кон *clindamycin* беа осетливи 1/5(20%) бактерии од видот *MRSA* и сите изолати на *MSSA*. Сите изолати на *MRSA* и *MSSA* беа осетливи кон *rifampicin*, *vancomycin* и *ceftaroline fosamil*.

Нашето истражување покажа дека од изолатите на *MSSA* мултирезистентни беа 8,3 %, а кај изолатите на *MRSA* сите изолати или 100% покажаа мултирезистентност на лекови или резистентност кон најмалку 3 групи на антибиотици. Во студијата на Sahle и соработниците мултирезистентноста на *MSSA* изнесувала 24,6% [269]. Оваа стапка била пониска од тие пријавени во Непал (41,7%) [323] и Адис Абеба (44,6%) [324].

Генерално резултатите од нашата студија покажаа дека *MSSA* и *MRSA*, и покрај појавата на мултирезистентни соеви сепак се со задоволителен процент на антибиотици на кои покажуваат осетливост и кои може да бидат терапија од избор во секојдневната пракса.

Резултатите од истражувањето спроведено од Chimi и соработниците покажало дека 65,8% од изолатите на *P.aeruginosa* биле отпорни на барем еден агенс во три или повеќе антиминобни категории и, поради тоа, биле категоризирани како

мултирезистентни [311]. Овој процент бил понизок од оној добиен од Моазами Гударзи и Ефтехар, кои покажале дека 97,4% од *P. aeruginosa* во рани биле мултирезистентни [325]. Сепак, Де Франческо и соработниците и Моазами Гударзи и Ефтехар пријавиле различна преваленца на мултирезистентност на *P. aeruginosa* (од 20% до 100%) [325, 326].

Набљудуваната разлика може да биде поради фактот што инфекциите со *P. aeruginosa* се комплексни во патогенезата и зависат од различни вирулентни фактори, како што се секреторните фактори, еластаза, фосфолипаза С, алкална протеаза, пиоцијанин, цијанид на водород, певердини и рамнолипиди [310]. *P. aeruginosa* исто така покажува исклучителна способност да развие понатамошна антимикробна отпорност на сите достапни антибиотици преку стекнување на хромозомски мутации [310]. Мобилноста на бактериите игра клучна улога во колонизацијата на површините од бактериите и следниот процес на формирање на отпорни заедници на бактерии наречени биофилмови.

Развојот на резистенција на *P. aeruginosa* кон многу антимикробни агенси претставува голем предизвик во контролата на нејзините инфекции [309]. Опсежното набљудување на антимикробната резистенција во европските земји за 2017 година покажало опсег на комбинирана резистенција (резистенција на три или повеќе антимикробни групи, вклучувајќи пиперацилин ± тазобактам, цефтазидим, флуорохинолони, аминок-гликозиди и карбапенеми) од 0% (Исланд) до 59,1% (Романија) [327]. Преваленцијата на мултирезистентен *P. aeruginosa* во Иран се проценува на 58%, со варијација во географските области: највисоките и најниските стапки биле забележани во Техеран (100%) и Заједан (16%), соодветно [328].

Антимикробната осетливост/резистентност на *P. aeruginosa* во нашето истражување покажа резистентност кон ampicillin, amoxicillin и amoxicillin-clavulanate во 100%.

Кон piperacillin-tazobactam беше забележана интермедиерна осетливост кај 8/10 (80%) изолати на *Pseudomonas aeruginosa*, а отпорни беа 20%. *Pseudomonas aeruginosa* покажаа интермедиерна осетливост кон ertapenem, додека отпорност

беше забележана кај 7/9 (77.78%) изолати. Интермедиерна осетливост кон imipenem имаа 10 (90.91%) изолати на *Pseudomonas aeruginosa*, а отпорни беа 1/11 (9.09%) изолати. Сите изолати беа осетливи кон meropenem. Отпорни кон cefuroxime, ceftazidime, ceftriaxone беа сите изолати на *Pseudomonas aeruginosa*. Отпорни кон ceferime беа 2/12 (16.67%) изолати, а 10/12 (83.33%) изолати беа со интермедиерна осетливост. Осетливи кон gentamicin беа 4/8 (50%) изолати на *Pseudomonas aeruginosa*, а отпорност и интермедиерна осетливост покажаа по 2 изолати или 25% од изолатите соодветно. Од 13 изолати на *Pseudomonas aeruginosa*, 12 (92.31%) беа осетливи, 1 (7.69%) беше отпорен кон amikacin. Сите изолати на *Pseudomonas aeruginosa* беа со интермедиерна осетливост кон ciprofloxacin, а резистентни кон co-trimoxazole.

Мултирезистентност покажаа 69,23 % од изолатите на *Pseudomonas aeruginosa*, и тоа со силен потенцијал за создавање биофилм беа 44,4%, со умерен потенцијал 22,2%, слаб 11,1% и без потенцијал за создавање биофилм беа 22,2%. Во овој случај доминираа изолатите со потенцијал за биофилм, што ја потврдува тезата дека присуството на биофилмот може да е причина за резистентност кон антибиотиките.

Затоа внимателната употреба на антимикробни агенси и високи стандарди на превенција и контрола на инфекции се неопходни за да се спречи понатамошен развој на резистентни соеви. Дополнително, комбинирани стратегии засновани на правилни анти-псеудомонални антибиотици со анти-биофилм агенси може да се користат за подобрување на лекувањето на инфекции поврзани со биофилм.

Нашите резултати покажаа мултирезистентност кај 82,35% од изолатите на *Enterobacter*, а во однос на антибиотската резистенција оваа грам негативна бактерија покажа 100% резистентност кон ampicillin, amoxicillin и amoxicillin-clavulonate. Висок процент на осетливост 94,12% покажа *Enterobacter* кон piperacillin-tazobactam, ertapenem, imipenem, meropenem, amikacin. Осетливоста кон групата цефалоспорински антибиотици конкретно кон cefuroxime, ceftazidime, ceftriaxone беше 35,29%, а кон ceferime беше поосетлив односно 87,5%. Висок процент на резистенција покажа кон gentamicin, co-trimoxazole 70,59%. Осетливоста

кон ciprofloxacin беше во 58,82%, а кон colistin 66,67%. Овие резултати делумно корелираат со резултатите од истражувањето на Isyaka и соработниците каде резистентноста кон пеницилински била 84,6% и осетливоста кон цефалоспорински антибиотици од 2 генерација била 30,8% [329].

Инфекциите предизвикани од биофилм се клинички значајни бидејќи бактериите во биофилмовите покажуваат отпорност на антимикробни соединенија. За елиминирање на производителите на биофилм може да бидат потребни високи концентрации на антимикробни средства. Сепак, ова може да не биде секогаш практично *in vivo* поради ризикот од токсичност и соодветни несакаани ефекти. Затоа, терапии со ниска концентрација на комбинирани лекови можат да бидат ефикасни за елиминирање на инфекции поврзани со биофилм. Раното откривање и скрининг на производителите на биофилм, а потоа нивното тестирање на осетливост на антимикробни средства е важно за избор на соодветен антимикробен агенс[315].

Присуството на мултирезистентни соеви во нашето истражување ја нагласува потребата од редовно следење на шемите на отпорност на лекови (надзор на лекови) за ефикасно да се контролира ширењето на отпорноста на лекови во болничкото опкружување. Континуираното следење треба да биде клучно во водењето на соодветни стратегии за третман и промоција на разумна употреба на антибиотици за ефективно справување со антимикробната резистентност.

Во нашата земја следењето на антимикробната резистенција е преку методологијата CAESAR (Central Asian and Eastern European Surveillance of Antimicrobial Resistance). CAESAR е единствената паневропска мрежа за надзор што ја следи антибиотската резистенција (AMR) надвор од рамките на ЕУ/ЕЕА. Таа опфаќа земји и региони во Европскиот регион на СЗО кои не се дел од EARS-Net, мрежата за надзор координирана од Европскиот центар за превенција и контрола на болести (ECDC). CAESAR обезбедува клучни податоци за поддршка на националните политики и зајакнување на напорите за одговор на AMR. Како дел од Глобалниот систем за надзор на антибиотска резистенција (GLASS), CAESAR претставува врска помеѓу регионалните и глобалните напори за справување со

AMR. Оваа иницијатива е заеднички проект на СЗО/Европа, ESCMID и Холандскиот национален институт за јавно здравје и животна средина (RIVM), преку кој CAESAR го унапредува надзорот на AMR со помош на соработка, научна експертиза и анализа базирана на податоци.

Податоците од 2021 покажуваат преваленција на *Staphylococcus aureus* од 22,01% во Македонија наспроти 22,8% во Европа. Застапеноста на *Enterococcus faecalis* и *Enterobacter* била пониска во Европа 4,7% и 12,5%, споредено со Македонија 10,34% и 28,64%. Повисока преваленца во Европа покажале *Escherichia coli* и *Pseudomonas aeruginosa* 41,4% и 6,5%, во однос на Македонија 11,93% и 3,18%.

Во периодот од 2013 –2021 година резистентноста на поедините инвазивни соеви изолирани од крв кај нас се движи во следниве рамки: 44,9% MRSA изолати, 59% HLGR *Enterococcus faecalis* (high level gentamicin resistant *Enterococcus*), 58% VRE (vancomycin resistant *Enterococcus*), 68,1% ESBL *Escherichia coli* (extended spectrum beta lactamase *Escherichia coli*), 91,5% ESBL *Enterobacter* (extended spectrum beta lactamase *Enterobacter*) и 28% CRPA(carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa*). Податоците укажуваат дека во овој период преваленцата на MRSA изолатите е повисока во Македонија споредено со Европа(43,4% vs 13,5%). Застапеноста на VRE е 74,4% во Македонија наспроти 17,2% во Европа и бележи тренд на пораст во последниве 7 години. Соевите на *Escherichia coli* резистентни на флуорокинолони се изолирани во 57,8 % во Македонија споредено со 21,9 % во Европа, а соевите резистентни на 3-та генерација цефалоспорини се изолирани во 60,1% во Македонија и 13,8% во Европа. Резистентоста кон флуорокинолони, цефалоспорини и карбапеними на *Enterobacter* е утврдена во 59,3%, 88,9% и 4,6% во Македонија споредено со 33,6%, 34,3% и 11,7% во Европа.

Состојбата со антибиотската резистенција во Европа покажува големи варијации во зависност од видот на бактеријата, групата на антимикробни средства и географскиот регион. Воопшто, ниски проценти на резистенција се пријавуваат од северните земји, додека високи проценти се пријавуваат од јужните и источните делови на Европа.

Додека кај грам-негативните бактерии е јасно изразен градиентот запад–исток во процентите на антибиотска резистенција, кај грам-позитивните бактерии тој тренд е помалку очигледен [330].

Ова не води кон фактот дека лекувањето и заздравувањето на хроничните рани не е исто во северозападна Европа и Балканот. При исти услови, високостручен кадар, заради високиот процент на отпорни бактерии кај нас, заздравувањето ќе биде многу подолго, потешко и поскапо.

Табела 36. Компаративна табела за антибиотска осетливост/резистентност

Изолат / Антибиотик	Наша студија	Останати студии
MSSA – Мултирезистентност	8,3%	24.6% -Sahle et al (41.7%) - Raza et al. (44.6%)-Seyoum et al
MSSA - Резистентност на пеницилин	91,3%	91.2% -Sahle et al. 86% - Budzynska et al.
MSSA – Осетливост на линезолид	100%	100% -Sahle et al. 100% - Budzynska et al.
MRSA – Осетливост на ванкомицин	100%	100%-Citron et al. 50%-Horne et al.
<i>P. aeruginosa</i> – Мултирезистентност	69,23%	65.8% -Chimi et al. 97.4% -Moazami et al
<i>Enterobacter spp.</i> – Резистентност на β -лактами	100%	84.6% -Isyaka et al.

6.6 Клинички импликации – биофилм и успех во третманот на хроничните рани

Биофилм продукцијата негативно влијае врз успехот на третманот. Кај речиси сите бактериски изолати, присуството на потенцијал за создавање биофилм беше поврзано со поголема веројатност за неуспешен третман. Особено ниска стапка на успешност имаше кај *Pseudomonas aeruginosa* (успешен третман кај само 9.09% од раните со изолат со биофилм).

Некои бактерии без биофилм потенцијал покажаа подобар резултат во третманот. Кај MSSA, пациентите со изолат без потенцијал за биофилм имаа нешто подобар исход (50%) споредено со оние со биофилм потенцијал (38.89%), но

разликата не беше статистички значајна ($p=1.0$). Заздравувањето на раните беше статистички сигнификантно поврзано со изолатот на *MSSA*. Ова корелира со податоците од студијата на Гарднер и соработниците кои укажуваат дека имајќи го предвид целиот микробиом на раната, времетраењето на раната позитивно корелира со бактериската разновидност и богатството на видови со релативно изобилство на протеобактерии и негативно корелира со релативно изобилство на *Staphylococcus spp* [331].

Површината на раните не беше поврзана со биофилм продукција. Немаше статистички значајна разлика во големината на раната меѓу пациенти со изолати со и без биофилм потенцијал, ниту пред, ниту за време на терапијата ($p>0.05$ во сите временски точки). И покрај разликите во успешноста, површината на раната се намалуваше слично во двете групи. И двете групи (со/без биофилм) покажаа подобрување со третманот, иако конечната големина на раната по 4 недели беше речиси идентична. Ова сугерира дека други фактори (тип на микроорганизам, имун одговор, терапија) исто така влијаат врз исходот.

Степенот на биофилм продукција е значаен предиктор за успехот на третманот. Постои статистички значајна зависност помеѓу степенот на биофилм продукција и заздравувањето на раната ($p=0.0006$). Успешен третман е забележан кај 50% од пациентите со *слаб* потенцијал, 16.67% со *умерен* и само 3.13% со *силен* биофилм потенцијал. Разликата помеѓу пациентите со слаб и силен биофилм потенцијал е статистички значајна ($p=0.0008$).

Површината на раната корелира со степенот на биофилм продукција. Пред третманот, пациентите со *силен* потенцијал имаа поголеми рани ($10.56 \pm 7.8 \text{ cm}^2$) во споредба со оние со *слаб* ($5.45 \pm 3.6 \text{ cm}^2$), но разликата не беше статистички значајна ($p=0.09$). Во текот на третманот, разликите стануваат статистички значајни во сите 4 недели ($p<0.01$ за сите временски точки). Третманот е најмалку ефикасен кај пациенти со силен биофилм потенцијал. Во сите временски точки (1-4 недели), највисоки вредности за површината на раната беа забележани кај пациентите со силен потенцијал. Пост-хоc анализите потврдуваат дека значајната разлика

произлегува од споредбата меѓу групите со *силен* и *слаб* потенцијал ($p=0.0096$, 0.0054 , 0.0024 , 0.0021 , по редослед на неделите).

Овие факти укажуваат дека присуството на биофилм кај бактериски изолати може значајно да го отежне третманот на хронични рани, особено кај одредени видови бактерии како *Pseudomonas aeruginosa*. Иако разликите во површината на раната не беа статистички значајни, трендот покажува дека изолатите со биофилм потенцијал се поврзани со пониска стапка на успешно заздравување.

Пациентите со силен потенцијал за продукција на биофилм имаат најмала веројатност за успешно заздравување на раната и најголема површина на раната во текот на третманот. Овие наоди укажуваат на потреба за специфични антимикробни стратегии насочени кон биофилмот кај вакви пациенти, за да се подобрат терапевтските резултати.

Ова беше еден мал примерок на испитаници, а во иднина неопходни се поголем број на испитаници и изолати кои ќе понудат повеќе и подетални информации за микробиологијата на хроничните рани, степенот на создавање на биофилм и неговата асоцираност со степенот на заздравување на раните.

7.0 ЗАКЛУЧОК

7.1 Од анализираните хронични рани во оваа студија 67% беа со изолиран микроорганизам од рана, а 33 % без изолиран микроорганизам. Најчесто беа изолирани следниве бактерии со различна застапеност: *MSSA* (35.82%), *Pseudomonas aeruginosa* (19.4%), *Enterobacter* (19.4%), и *Escherichia coli* (17.91%),

7.2 Кај 71,9% од изолатите од хронични рани се докажа потенцијал за биофилм. Биофилм продуцирачки беа *MSSA* 81,81%, *Pseudomonas aeruginosa* 84,61%, *Enterobacter* 92,3%, *MRSA* 20%, *Escherichia coli* 44,44%, *Proteus* 66,66%, *Enterococcus* 80%, *Acinetobacter* 100%, *Stenotrophomonas maltophilia* 33,3%, *Corynebacterium gr* 100%, *Serratia* 0%, *Nediferencirani gr- bacilli* 100% и *Achromobacter denitrificans* 100%.

7.3 Резистентноста кон група пеницилини беше со висок процент 90%-100% кај Грам (+) и кај Грам (-) изолати. Кон групата цефалоспорини 100% резистентност имаа изолатите на *MRSA*, и повеќе од половина од Грам(-) изолати. Висока резистентност се докажа и кон карбапенемските антибиотици од страна на Грам (-) изолати.

7.4 Значајно почесто заздравување на раната имаа пациентите без изолирани микроорганизми, односно, третманот на раната беше успешен кај 81.82% пациенти без изолат и 16.42% пациенти со изолат на микроорганизми ($p<0.0001$). По 3 недели од третманот разликата во површината на раната кај пациентите со позитивен и негативен изолат беше статистички значајна ($p=0.032$).

7.5 Заздравувањето на раната сигнификантно беше асоцирано со инфицирање на раната со *MSSA* ($p=0.0004$), и се должи на значајно почеста колонизација на раните со оваа бактерија со успешен третман

7.6 Не се утврди значајна разлика во заздравувањето на рани кај пациентите со изолати зависно од нивниот потенцијал за создавање биофилм, односно немаше разлика во заздравувањето и површините на раните со изолат без и со потенцијал за создавање биофилм.

7.7 Заздравувањето на раната значително зависеше од степенот на продукција на биофилм ($p=0.0006$). Меѓугрупната компарација на изолатите со слаб, умерен и

силен потенцијал за создавање биофилм покажа значајна разлика меѓу групите со слаб и силен потенцијал, односно, третманот на раната беше значајно почесто поуспешен кај пациентите со изолат со слаб потенцијал за биофилм споредено со пациентите со изолат со силен потенцијал – 50% vs 3.13%, $p=0.0008$. Површината на раната значајно зависеше од степенот на продукција на биофилм во целиот едномесечен третман (вкупна статистичка сигнификантна разлика од $p=0.0011$, $p=0.0007$, $p=0.0032$ и $p=0.0028$, соодветно по 1,2,3 и 4 недели третман)

7.8 Не постои разлика во осетливоста кон антимикробните средства помеѓу изолатите со и без потенцијал за биофилм. Во однос на антимикробната осетливост на изолатите споредена *in vitro* и *in vivo* резултатите укажуваат дека после спроведување на антибиотски третман изолатите од контролните брисеви беа со понизок степен на создавање на биофилм. Ова најверојатно се должи на фактот дека биофилмот со неговата специфична градба и структура е механичка бариера за антибиотиците и го оневозможува нивното дејство.

И покрај значењето на добиените резултати, оваа студија има неколку ограничувања. Прво, анализата на микробиолошките изолати и нивниот потенцијал за формирање биофилм беше изведена *in vitro*, што не секогаш ја одразува сложената *in vivo* средина на хроничните рани. Второ, хетерогеноста на популацијата на испитаници, различната етиологија на раните и претходната изложеност на антибиотици може да влијаат врз микробниот спектар и антимикробната резистенција, што го ограничува генерализирањето на резултатите. Дополнително, примената на класични микробиолошки методи може да пропушти одредени патогени кои се дел од биофилмот, но не растат лесно во стандардни услови. Конечно, ограничениот број примероци и еднократната временска точка на земање на брисеви не дозволуваат динамичко следење на микробиолошките промени и развојот на биофилмот со тек на времето. Ова беше еден мал примерок на испитаници, а во иднина неопходни се поголем број на испитаници и изолати кои ќе понудат повеќе и подетални информации за микробиологијата на хроничните рани, степенот на создавање на биофилм и неговата асоцираност со степенот на заздравување на раните.

Овие лимитации ја нагласуваат потребата од понатамошен развој на стандарди и технологии за прецизно, континуирано и клинички применливо следење на биофилмот во хроничните рани.

За крај, оваа дисертација го истакнува фактот дека присуството на биофилм кај бактериски изолати и нивната резистентност кон антимикробните средства може значајно да го отежнува третманот на хронични рани, особено кај одредени видови бактерии. Трендот покажува дека изолатите со биофилм потенцијал се поврзани со пониска стапка на успешно заздравување. Пациентите со изолат со силен потенцијал за продукција на биофилм имаат најмала веројатност за успешно заздравување на раната и најголема површина на раната во текот на третманот, односно побавно заздравуваат.

Овие наоди укажуваат на потребата за специфични антимикробни стратегии насочени кон биофилмот кај вакви пациенти, за да се подобрат терапевтските резултати.

Анекс 1

Студиски број _____

Име и презиме _____

Базични карактеристики на пациентите

пол	Машки Женски
возраст	
националност	Македонска Албанска Турска Влашка Српска Ромска Друго
Професија/хоби	
Пушач	Да Не
Живее	сам со фамилија
Нутритивен статус	Нема апетит Јаде нормално Не јаде месо/риба/зеленчук/овошје
Коморбидитети(Други хронични болести)	

Листа на лекови кои пациентот редовно ги употребува од пред појавата на хроничната рана

	Генеричко име на лекот	Доза	Време колку долго го прима лекот

Коментар

Анекс 2

Студиски број _____

Име и презиме _____

Податоци поврзани со хроничните улкуси(рани)

Време на појавување/траење на раната			
Број на рани			
Дали е третирана раната/раните	Да	Не	
Каков третман е спроведен	Локална терапија Перорална терапија		
Дали прима антибиотик на уста во последните 7 дена	Да	Не	
Дали аплицира антибиотик на рана во последните 7 дена	Да	Не	
Димензии на рана/рани(површина во cm ²)			
Локализација на рана/рани			
Знаци за воспаление на рана/рани	Оток	да	не
	Црвенило	да	не
	Болка	да	не
	Секрет	да	не
Клинички знаци за присуство на биофилм во рана/рани	Прекумерна ексудација да не Претходен третман со антибиотик без подобрување да не Повторувачки инфекции на рана да не Продолжено заздравување на рана да не		
Околина на рана/рани	Еритем	да	не
	Хиперпигментација	да	не
	Губиток на влакна	да	не
	Екцематизација	да	не

Коментар

8.0 КОРИСТЕНА ЛИТЕРАТУРА

1. Yousef H, Alhajj M, Sharma S. Anatomy, Skin (Integument), Epidermis. StatPearls Publishing; 2023. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470464/>
2. Oualla-Bachiri W, Fernández-González A, Quiñones-Vico MI, Arias-Santiago S. From grafts to human bioengineered vascularized skin substitutes. *Int J Mol Sci.* 2020;21(22):8197.
3. Blair MJ, Jones JD, Woessner AE, Quinn KP. Skin structure-function relationships and the wound healing response to intrinsic aging. *Adv Wound Care (New Rochelle).* 2020;9(3):127–43.
4. Williams KL, Garza LA. Diverse cellular players orchestrate regeneration after wounding. *Exp Dermatol.* 2021;30(5):605–12.
5. Abdulah AM, Abdulah NDH. Ministry of Health Malaysia: Wound care manual. 1st ed. 2014.
6. Wilkinson HN, Hardman MJ. Wound healing: Cellular mechanisms and pathological outcomes. *Open Biol.* 2020;10(9):200223.
7. Frykberg RG, Banks J. Challenges in the treatment of chronic wounds. *Adv Wound Care (New Rochelle).* 2015;4(9):560–82.
8. Werdin F, Tennenhaus M, Schaller HE, Rennekampff HO. Evidence-based management strategies for treatment of chronic wounds. *Eplasty.* 2009;9:e19.
9. Cavallo I, Lesnoni La Parola I, Sivori F, Toma L, Koudriavtseva T, Sperduti I, et al. Homocysteine and inflammatory cytokines in the clinical assessment of infection in venous leg ulcers. *Antibiotics.* 2022;11(9):1268.
10. Rodrigues M, Kosaric N, Bonham CA, Gurtner GC. Wound healing: A cellular perspective. *Physiol Rev.* 2019;99(1):665–706.
11. Opneja A, Kapoor S, Stavrou EX. Contribution of platelets, the coagulation and fibrinolytic systems to cutaneous wound healing. *Thromb Res.* 2019;179:56–63.
12. Kim SY, Nair MG. Macrophages in wound healing, activation and plasticity. *Immunol Cell Biol.* 2019;97(3):258–67.
13. Jiang Y, Tsoi LC, Billi AC, Ward NL, Harms PW, Zeng C, et al. Cytokinocytes: the diverse contribution of keratinocytes to immune responses in skin. *JCI Insight.* 2020;5(20):e142067.
14. Nguyen AV, Soulika AM. The dynamics of the skin's immune system. *Int J Mol Sci.* 2019;20(8):1811.
15. Munoz LD, Sweeney MJ, Jameson JM. Skin resident $\gamma\delta$ T cell function and regulation in wound repair. *Int J Mol Sci.* 2020;21(24):9286.
16. Morgun EI, Vorotelyak EA. Epidermal stem cells in hair follicle cycling and skin regeneration: a view from the perspective of inflammation. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:581697.
17. Dunnill C, Patton T, Brennan J, Barrett J, Dryden M, Cooke J, et al. Reactive oxygen species (ROS) and wound healing: the functional role of ROS and

- emerging ROS-modulating technologies for augmentation of the healing process. *Int Wound J*. 2017;14(1):89–96.
18. Larouche J, Sheoran S, Maruyama K, Martino MM. Immune regulation of skin wound healing: mechanisms and novel therapeutic targets. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2018;7(6):209–31.
 19. Zhao R, Liang H, Clarke E, Jackson C, Xue M. Inflammation in chronic wounds. *Int J Mol Sci*. 2016;17(12):2085.
 20. Landén NX, Li D, Ståhle M. Transition from inflammation to proliferation: a critical step during wound healing. *Cell Mol Life Sci*. 2016;73(20):3861–85.
 21. Cheng F, Shen Y, Mohanasundaram P, Lindström M, Ivaska J, Ny T, et al. Vimentin coordinates fibroblast proliferation and keratinocyte differentiation in wound healing via TGF- β -Slug signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(30):E4320–7.
 22. Blanpain C, Fuchs E. Epidermal homeostasis: a balancing act of stem cells in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009;10(3):207–17.
 23. Schmidt BA, Horsley V. Intradermal adipocytes mediate fibroblast recruitment during skin wound healing. *Development*. 2013;140(7):1517–27.
 24. Hao Z, Qi W, Sun J, Zhou M, Guo N. Research progress of adipose-derived stem cells in the treatment of chronic wounds. *Front Chem*. 2023;11:1094693.
 25. Diller RB, Tabor AJ. The role of the extracellular matrix (ECM) in wound healing: a review. *Biomimetics*. 2022;7(3):87.
 26. Tomic-Canic M, Burgess JL, O'Neill KE, Strbo N, Pastar I. Skin microbiota and its interplay with wound healing. *Am J Clin Dermatol*. 2020;21(1):36–43.
 27. Brun C, Jean-Louis F, Oddos T, Bagot M, Bensussan A, Michel L. Phenotypic and functional changes in dermal primary fibroblasts isolated from intrinsically aged human skin. *Exp Dermatol*. 2016;25(2):113–9.
 28. Vallée A, Lecarpentier Y. TGF- β in fibrosis by acting as a conductor for contractile properties of myofibroblasts. *Cell Biosci*. 2019;9:98.
 29. Pakshir P, Noskovicova N, Lodyga M, Son DO, Schuster R, Goodwin A, et al. The myofibroblast at a glance. *J Cell Sci*. 2020;133(13):jcs227900.
 30. Van De Water L, Varney S, Tomasek JJ. Mechanoregulation of the myofibroblast in wound contraction, scarring, and fibrosis: Opportunities for new therapeutic intervention. *Adv Wound Care*. 2013;2(4):122–41.
 31. Sorg H, Tilkorn DJ, Hager S, Hauser J, Mirastschijski U. Skin wound healing: An update on the current knowledge and concepts. *Eur Surg Res*. 2017;58(1–2):81–94.
 32. Bishop A. Role of oxygen in wound healing. *J Wound Care*. 2008;17(9):399–402.
 33. Rodriguez PG, Felix FN, Woodley DT, Shim EK. The role of oxygen in wound healing: a review of the literature. *Dermatol Surg*. 2008;34(9):1159–69.
 34. Gosain A, DiPietro LA. Aging and wound healing. *World J Surg*. 2004;28(3):321–6.

35. Keylock KT, Vieira VJ, Wallig MA, DiPietro LA, Schrementi M, Woods JA. Exercise accelerates cutaneous wound healing and decreases wound inflammation in aged mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2008;294(1):R179–85.
36. Swift ME, Burns AL, Gray KL, DiPietro LA. Age-related alterations in the inflammatory response to dermal injury. *J Invest Dermatol*. 2001;117(5):1027–35.
37. Glaser R, Kiecolt-Glaser JK. Stress-induced immune dysfunction: implications for health. *Nat Rev Immunol*. 2005;5(3):243–51.
38. Vileikyte L. Stress and wound healing. *Clin Dermatol*. 2007;25(1):49–55.
39. Godbout JP, Glaser R. Stress-induced immune dysregulation: implications for wound healing, infectious disease and cancer. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2006;1(4):421–7.
40. Boyapati L, Wang HL. The role of stress in periodontal disease and wound healing. *Periodontol 2000*. 2007; 44:195–210.
41. Sternberg EM. Neural regulation of innate immunity: a coordinated nonspecific host response to pathogens. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(4):318–28.
42. Wilson JA, Clark JJ. Obesity: impediment to postsurgical wound healing. *Adv Skin Wound Care*. 2004;17(8):426–32.
43. Anaya DA, Dellinger EP. The obese surgical patient: a susceptible host for infection. *Surg Infect (Larchmt)*. 2006;7(5):473–80.
44. Greco JA 3rd, Castaldo ET, Nanney LB, Wendel JJ, Summitt JB, Kelly KJ, et al. The effect of weight loss surgery and body mass index on wound complications after abdominal contouring operations. *Ann Plast Surg*. 2008;61(3):235–42.
45. Momeni A, Heier M, Bannasch H, Stark GB. Complications in abdominoplasty: a risk factor analysis. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2009;62(10):1250–4.
46. Arnold M, Barbul A. Nutrition and wound healing. *Plast Reconstr Surg*. 2006;117(7 Suppl):42S–58S.
47. Edwards R, Harding KG. Bacteria and wound healing. *Curr Opin Infect Dis*. 2004;17(2):91–6.
48. Lejeune P. Contamination of abiotic surfaces: What a colonizing bacterium sees and how to blur it. *Trends Microbiol*. 2003;11(4):179–84.
49. Rendueles O, Ghigo JM. Multi-species biofilms: How to avoid unfriendly neighbors. *FEMS Microbiol Rev*. 2012;36(5):972–89.
50. Kong KF, Vuong C, Otto M. *Staphylococcus* quorum sensing in biofilm formation and infection. *Int J Med Microbiol*. 2006;296(2–3):133–9.
51. White C, Sharman AK, Gadd GM. An integrated microbial process for the bioremediation of soil contaminated with toxic metals. *Nat Biotechnol*. 1998;16(6):572–5.
52. Wilking JN, Zaburdaev V, De Volder M, Losick R, Brenner MP, Weitz DA. Liquid transport facilitated by channels in *Bacillus subtilis* biofilms. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(3):848–52.

53. Olsson M, Järbrink K, Divakar U, Bajpai R, Upton Z, Schmidtchen A, et al. The humanistic and economic burden of chronic wounds: A systematic review. *Wound Repair Regen.* 2019;27(1):114–25.
54. Martinengo L, Olsson M, Bajpai R, Soljak M, Upton Z, Schmidtchen A, et al. Prevalence of chronic wounds in the general population: systematic review and meta-analysis of observational studies. *Ann Epidemiol.* 2019;29:8–15.
55. Leaper D, Assadian O, Edmiston CE. Approach to chronic wound infections. *Br J Dermatol.* 2015;173(2):351–8.
56. Wolcott RD, Hanson JD, Rees EJ, Koenig LD, Phillips CD, Wolcott RA, et al. Analysis of the chronic wound microbiota of 2,963 patients by 16S rDNA pyrosequencing. *Wound Repair Regen.* 2016;24(1):163–74.
57. Loesche M, Gardner SE, Kalan L, Horwinski J, Zheng Q, Hodgkinson BP, et al. Temporal stability in chronic wound microbiota is associated with poor healing. *J Invest Dermatol.* 2017;137(1):237–44.
58. Kalan LR, Meisel JS, Loesche MA, Horwinski J, Soaita I, Chen X, et al. Strain- and species-level variation in the microbiome of diabetic wounds is associated with clinical outcomes and therapeutic efficacy. *Cell Host Microbe.* 2019;25(5):641–55.e5.
59. Kalan L, Grice EA. Fungi in the wound microbiome. *Adv Wound Care (New Rochelle).* 2018;7(7):247–55.
60. Verbanic S, Shen Y, Lee J, Deacon J, Chen I. Microbial predictors of healing and short-term effect of debridement on the microbiome of chronic wounds. *Biofilms Microbiomes.* 2020;6:21.
61. Rodrigues M, Kosaric N, Bonham CA, Gurtner GC. Wound healing: a cellular perspective. *Physiol Rev.* 2019;99(1):665–706.
62. Londahl M, Katzman P, Nilsson A, Hammarlund C. Hyperbaric oxygen therapy facilitates healing of chronic foot ulcers in patients with diabetes. *Diabetes Care.* 2010;33(5):998–1003.
63. James GA, Zhao A, Usui M, Underwood RA, Nguyen H, Beyenal H, et al. Microsensor and transcriptomic signatures of oxygen depletion in biofilms associated with chronic wounds. *Wound Repair Regen.* 2016;24(2):373–83.
64. Morgan SJ, Lippman SI, Bautista GE, Harrison JJ, Harding CL, Gallagher LA, et al. Bacterial fitness in chronic wounds appears to be mediated by the capacity for high-density growth, not virulence or biofilm functions. *PLoS Pathog.* 2019;15(3):e1007511.
65. Short B, Bakri A, Baz A, Williams C, Brown J, Ramage G. There is more to wounds than bacteria: fungal biofilms in chronic wounds. *Curr Clin Microbiol Rep.* 2023;10:9–16.
66. Findley K, Oh J, Yang J, Conlan S, Deming C, Meyer JA, et al. Topographic diversity of fungal and bacterial communities in human skin. *Nature.* 2013;498(7454):367–70.

67. Kalan L, Loesche M, Hodkinson BP, Heilmann K, Ruthel G, Gardner SE, et al. Redefining the chronic-wound microbiome: fungal communities are prevalent, dynamic, and associated with delayed healing. *mBio*. 2016;7(5):e01058-16.
68. Chellan G, Shivaprakash S, Ramaiyar SK, Varma AK, Varma N, Sukumaran MT, et al. Spectrum and prevalence of fungi infecting deep tissues of lower-limb wounds in patients with type 2 diabetes. *J Clin Microbiol*. 2010;48(6):2097–102.
69. Fatahinia M, Poormohamadi F, Mahmoudabadi AZ. Comparative study of esterase and hemolytic activities in clinically important *Candida* species, isolated from oral cavity of diabetic and non-diabetic individuals. *Jundishapur J Microbiol*. 2015;8(3):e20893.
70. Dowd SE, Hanson JD, Rees E, et al. Survey of fungi and yeast in polymicrobial infections in chronic wounds. *J Wound Care*. 2011;20(1):40–7.
71. Mehra BK, Singh AK, Gupta D, Narang R, Patil R. A clinicomicrobiological study on incidence of mycotic infections in diabetic foot ulcers. *Int J Sci Study*. 2017;4:50–4.
72. Costerton JW, Cheng KJ, Geesey GG, Ladd TI, Nickel JC, Dasgupta M, et al. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu Rev Microbiol*. 1987;41:435–64.
73. Cowan T. Biofilms and their management: From concept to clinical reality. *J Wound Care*. 2011;20(5):222–6.
74. Branda SS, Vik S, Friedman L, Kolter R. Biofilms: The matrix revisited. *Trends Microbiol*. 2005;13(1):20–6.
75. Chapman MR, Robinson LS, Pinkner JS, Roth R, Heuser J, Hammar M, et al. Role of *Escherichia coli* curli operons in directing amyloid fiber formation. *Science*. 2002;295(5556):851–5.
76. Steinberg N, Kolodkin-Gal I. The matrix reloaded: Probing the extracellular matrix synchronizes bacterial communities. *J Bacteriol*. 2015;197(12):2092–103.
77. Hurlow J, Couch K, Laforet K, Bolton L, Metcalf D, Bowler P. Clinical biofilms: a challenging frontier in wound care. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2015;4(5):295–301.
78. Sangwan S, Pratibha P, Hemender T. Anti-biofilm enzymes: a strategy to remove biofilms. *Agrobios*. 2019;17(12):35–75.
79. Grant SS, Hung DT. Persistent bacterial infections, antibiotic tolerance, and the oxidative stress response. *Virulence*. 2013;4(4):273–83.
80. Clinton A, Carter T. Chronic wound biofilms: pathogenesis and potential therapies. *Lab Med*. 2015;46(4):277–84.
81. Diggle SP, Winzer K, Lazdunski A, Williams P, Cámara M. Advancing the quorum in *Pseudomonas aeruginosa*: MvaT and the regulation of N-acylhomoserine lactone production and virulence gene expression. *J Bacteriol*. 2002;184(10):2576–86.
82. Antunes LC, Ferreira RB. Intercellular communication in bacteria. *Crit Rev Microbiol*. 2009;35(1):69–80.

83. Kleerebezem M, Quadri LE, Kuipers OP, de Vos WM. Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal-transduction systems in Gram-positive bacteria. *Mol Microbiol.* 1997;24(5):895–904.
84. Novick RP, Geisinger E. Quorum sensing in staphylococci. *Annu Rev Genet.* 2008;42:541–64.
85. Kong KF, Vuong C, Otto M. Staphylococcus quorum sensing in biofilm formation and infection. *Int J Med Microbiol.* 2006;296(2–3):133–9.
86. Vuong C, Saenz HL, Gotz F, Otto M. Impact of the agr quorum-sensing system on adherence to polystyrene in Staphylococcus aureus. *J Infect Dis.* 2000;182(6):1688–93.
87. Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB. Establishment of Pseudomonas aeruginosa infection: lessons from a versatile opportunist. *Microbes Infect.* 2000;2(9):1051–60.
88. Skindersoe ME, Zeuthen LH, Brix S, Fink LN, Lazenby J, Whittall C, et al. Pseudomonas aeruginosa quorum-sensing signal molecules interfere with dendritic cell-induced T-cell proliferation. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2009;55(3):335–45.
89. Zhou L, Zhang Y, Ge Y, Zhu X, Pan J. Regulatory mechanisms and promising applications of quorum sensing-inhibiting agents in control of bacterial biofilm formation. *Front Microbiol.* 2020;11:589640.
90. Bjarnsholt T, Kirketerp-Møller K, Jensen PØ, Madsen KG, Phipps R, Krogfelt K, et al. Why chronic wounds will not heal: a novel hypothesis. *Wound Repair Regen.* 2008;16(1):2–10.
91. Hendricks KJ, Burd TA, Anglen JO, Simpson AW, Christensen GD, Gainor BJ. Synergy between Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa in a rat model of complex orthopaedic wounds. *J Bone Joint Surg Am.* 2001;83(6):855–61.
92. Mikamo H, Kawazoe K, Izumi K, Watanabe K, Ueno K, Tamaya T. Studies on the pathogenicity of anaerobes, especially Prevotella bivia, in a rat pyometra model. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 1998;6(2):61–5.
93. Dalton T, Dowd SE, Wolcott RD, Sun Y, Watters C, Griswold JA, et al. An in vivo polymicrobial biofilm wound infection model to study interspecies interactions. *PLoS One.* 2011;6(11):e27317.
94. Wolcott RD, Rhoads DD, Bennett ME, et al. Chronic wounds and the medical biofilm paradigm. *J Wound Care.* 2010;19:45–6, 48–50, 52–3.
95. Jensen ET, Kharazmi A, Lam K, et al. Human polymorphonuclear leukocyte response to Pseudomonas aeruginosa grown in biofilms. *Infect Immun.* 1990;58(7):2383–5.
96. Jensen PØ, Bjarnsholt T, Phipps R, et al. Rapid necrotic killing of polymorphonuclear leukocytes is caused by quorum-sensing-controlled production of rhamnolipid by Pseudomonas aeruginosa. *Microbiology.* 2007;153(5):1329–38.

97. Seth AK, Geringer MR, Gurjala AN, et al. Understanding the host inflammatory response to wound infection: an in vivo study of *Klebsiella pneumoniae* in a rabbit ear wound model. *Wound Repair Regen.* 2012;20(2):214–25.
98. McClure CD, Schiller NL. Effects of *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids on human monocyte-derived macrophages. *J Leukoc Biol.* 1992;51(2):97–102.
99. Schooling SR, Beveridge TJ. Membrane vesicles: an overlooked component of the matrices of biofilms. *J Bacteriol.* 2006;188(16):5945–57.
100. Gabillot-Carre M, Roujeau JC. Acute bacterial skin infections and cellulitis. *Curr Opin Infect Dis.* 2007;20:118-23.
101. Bayles KW. The biological role of death and lysis in biofilm development. *Nat Rev Microbiol.* 2007;5:721-6.
102. Zhao G, Usui ML, Underwood RA, et al. Time course study of delayed wound healing in a biofilm-challenged diabetic mouse model. *Wound Repair Regen.* 2012;20:342-52.
103. Greenhalgh DG. The role of apoptosis in wound healing. *Int J Biochem Cell Biol.* 1998;30:1019-30.
104. Guzik K, Bzowska M, Smagur J, et al. A new insight into phagocytosis of apoptotic cells: proteolytic enzymes divert the recognition and clearance of polymorphonuclear leukocytes by macrophages. *Cell Death Differ.* 2007;14:171-82.
105. Nwomeh BC, Yager DR, Cohen IK. Physiology of the chronic wound. *Clin Plast Surg.* 1998;25:341-56.
106. Eftimiadi C, Buzzi E, Tonetti M, et al. Short-chain fatty acids produced by anaerobic bacteria alter the physiological responses of human neutrophils to chemotactic peptide. *J Infect.* 1987;14:43-53.
107. Wolcott RD, Rhoads DD, Dowd SE. Biofilms and chronic wound inflammation. *J Wound Care.* 2008;17:333-41.
108. Ganapathy N, Venkataraman SS, Daniel R, et al. Molecular biology of wound healing. *J Pharm Bioallied Sci.* 2012;4(suppl 2):S334–S337.
109. Mustoe TA, O’Shaughnessy K, Kloeters O. Chronic wound pathogenesis and current treatment strategies: a unifying hypothesis. *Plast Reconstr Surg.* 2006;117(suppl):35S–41S.
110. Dalton SJ, Mitchell DC, Whiting CV, et al. Abnormal extracellular matrix metabolism in chronically ischemic skin: a mechanism for dermal failure in leg ulcers. *J Invest Dermatol.* 2005;125:373-9.
111. Ladwig GP, Robson MC, Liu R, et al. Ratios of activated matrix metalloproteinase-9 to tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 in wound fluids are inversely correlated with healing of pressure ulcers. *Wound Repair Regen.* 2002;10:26-37.
112. Harding KG, Moore K, Phillips TJ. Wound chronicity and fibroblast senescence—implications for treatment. *Int Wound J.* 2005;2:364-8.

113. Kirker KR, Secor PR, James GA, et al. Loss of viability and induction of apoptosis in human keratinocytes exposed to *Staphylococcus aureus* biofilms in vitro. *Wound Repair Regen.* 2009;17:690-9.
114. Loryman C, Mansbridge J. Inhibition of keratinocyte migration by lipopolysaccharide. *Wound Repair Regen.* 2008;16:45-51.
115. Schierle CF, De la Garza M, Mustoe TA, et al. Staphylococcal biofilms impair wound healing by delaying reepithelialization in a murine cutaneous wound model. *Wound Repair Regen.* 2009;17:354-9.
116. Jeffery Marano R, Jane Wallace H, Wijeratne D, et al. Secreted biofilm factors adversely affect cellular wound healing responses in vitro. *Sci Rep.* 2015;5:13296.
117. Allison DL, Willems HME, Jayatilake JAMS, Bruno VM, Peters BM, Shirtliff ME. Candida-bacteria interactions: their impact on human disease. *Microbiol Spectr.* 2016;4(3):103-136. doi: 10.1128/microbiolspec.VMBF-0030-2016.
118. Kong EF, Tsui C, Kucharíková S, Andes D, Dijck PV, Jabra-Rizk MA. Commensal protection of *Staphylococcus aureus* against antimicrobials by *Candida albicans* biofilm matrix. *mBio.* 2016;7(5):e01365-e01316. doi: 10.1128/mBio.01365-16.
119. Todd OA, Fidel PL Jr, Harro JM, Hilliard JJ, Tkaczyk C, Sellman BR, et al. *Candida albicans* augments *Staphylococcus aureus* virulence by engaging the Staphylococcal agr Quorum Sensing System. *mBio.* 2019;10(3):e00910. doi: 10.1128/mBio.00910-19.
120. Vila T, Kong EF, Montelongo-Jauregui D, Van Dijck P, Shetty AC, McCracken C, et al. Therapeutic implications of *C. albicans*-*S. aureus* mixed biofilm in a murine subcutaneous catheter model of polymicrobial infection. *Virulence.* 2021;12(1):835-851. doi: 10.1080/21505594.2021.1894834.
121. Short B, Delaney C, McKloud E, Brown JL, Kean R, Litherland GJ, et al. Investigating the transcriptome of *Candida albicans* in a dual-species *Staphylococcus aureus* biofilm model. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021;11:791523. doi: 10.3389/fcimb.2021.791523.
122. Townsend EM, Sherry L, Kean R, Hansom D, Mackay WG, Williams C, et al. Implications of antimicrobial combinations in complex wound biofilms containing fungi. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;61(9):e00672. doi: 10.1128/AAC.00672-17.
123. Yu XY, Fu F, Kong WN, Xuan QK, Wen DH, Chen XQ, et al. *Streptococcus agalactiae* inhibits *Candida albicans* hyphal development and diminishes host vaginal mucosal TH17 response. *Front Microbiol.* 2018;9:198. doi: 10.3389/fmicb.2018.00198.
124. Shing SR, Ramos AR, Patras KA, Riestra AM, McCabe S, Nizet V, et al. The fungal pathogen *Candida albicans* promotes bladder colonization of group B *Streptococcus*. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020;9:437. doi: 10.3389/fcimb.2019.00437.

125. Felton T, Troke PF, Hope WW. Tissue penetration of antifungal agents. *Clin Microbiol Rev.* 2014;27(1):68-88. doi: 10.1128/CMR.00046-13.
126. Hall-Stoodley L, Stoodley P, Kathju S, et al. Towards diagnostic guidelines for biofilm-associated infections. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2012;65(2):127-145.
127. Schultz G, Bjarnsholt T, James GA, et al. Consensus guidelines for the identification and treatment of biofilms in chronic nonhealing wounds. *Wound Repair Regen.* 2017;25(5):744-757.
128. Haesler E, Swanson T, Ousey K, Carville K. Clinical indicators of wound infection and biofilm: reaching international consensus. *J Wound Care.* 2019;28(Suppl 3b):s4-s12.
129. Liu Y, Long S, Wang H, Wang Y. Biofilm therapy for chronic wounds. *Int Wound J.* 2024;21(2):e14667. doi: 10.1111/iwj.14667.
130. Hoiby N, et al. ESCMID guideline for the diagnosis and treatment of biofilm infections 2014. *Clin Microbiol Infect.* 2015;21(S1):S1-25.
131. Lipsky BA, et al. 2012 Infectious Diseases Society of America clinical practice guideline for the diagnosis and treatment of diabetic foot infections. *Clin Infect Dis.* 2012;54:e132–e173.
132. Percival SL, et al. Biofilms and wounds: an overview of the evidence. *Adv Wound Care (New Rochelle).* 2015;4:373–381.
133. Bjarnsholt T, et al. The in vivo biofilm. *Trends Microbiol.* 2013;21:466–474.
134. Kennedy P, et al. Burns, biofilm and a new appraisal of burn wound sepsis. *Burns.* 2010;36:49–56.
135. Rhoads DD, et al. Comparison of culture and molecular identification of bacteria in chronic wounds. *Int J Mol Sci.* 2012;13:2535–2550.
136. Hall-Stoodley L, et al. Towards diagnostic guidelines for biofilm associated infections. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2012;65:127–145.
137. Dowd SE, et al. Polymicrobial nature of chronic diabetic foot ulcer biofilm infections determined using bacterial tag encoded FLX amplicon pyrosequencing (bTEFAP). *PLoS One.* 2008;3:e3326.
138. Singer AJ, et al. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med.* 1999;341:738–746.
139. Martin JM, et al. Molecular microbiology: new dimensions for cutaneous biology and wound healing. *J Invest Dermatol.* 2010;130:38–48.
140. Li L, et al. The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens. *Front Microbiol.* 2014;5:258.
141. Flemming HC, et al. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat Rev Microbiol.* 2016;14:563–575.
142. Pinto D, et al. Thirty years of viable but nonculturable state research: unsolved molecular mechanisms. *Crit Rev Microbiol.* 2013;41:61–76.
143. Nguyen D, et al. Active starvation responses mediate antibiotic tolerance in biofilms and nutrient-limited bacteria. *Science.* 2011;334:982–986.

144. Drago L, et al. Use of dithiothreitol to improve the diagnosis of prosthetic joint infections. *J Orthop Res.* 2013;31:1694–1699.
145. Trampuz A, et al. Sonication of removed hip and knee prostheses for diagnosis of infection. *N Engl J Med.* 2007;357:654–663.
146. Kolbert CP, Persing DH. Ribosomal DNA sequencing as a tool for identification of bacterial pathogens. *Curr Opin Microbiol.* 1999;2:299–305.
147. Davies CE, et al. Use of 16S ribosomal DNA PCR and denaturing gradient gel electrophoresis for analysis of the microflora of healing and nonhealing chronic venous leg ulcers. *J Clin Microbiol.* 2004;42:3549–3557.
148. Dowd SE, et al. Survey of bacterial diversity in chronic wounds using pyrosequencing, DGGE, and full ribosome shotgun sequencing. *BMC Microbiol.* 2008;8:43.
149. Cerqueira L, et al. DNA mimics for the rapid identification of microorganisms by fluorescence in situ hybridization (FISH). *Int J Mol Sci.* 2008;9:1944–1960.
150. Malic S, et al. Detection and identification of species bacteria in wound biofilms using peptide nucleic acid fluorescent in situ hybridization (PNA FISH). *Microbiology.* 2009;155:2603–2611.
151. Kirketerp-Moller K, et al. Distribution, organization, and ecology of bacteria in chronic wounds. *J Clin Microbiol.* 2008;46:2717–2722.
152. Schultz G, et al. University of Florida Research Foundation. Materials and methods for assessing and mapping microbes and microbial biofilms on wounds. USPA 20160025724.
153. Garalde DR, et al. Highly parallel direct RNA sequencing on an array of nanopores. *Nat Methods.* 2018;15:201–206.
154. Liu Y, Long S, Wang H, Wang Y. Biofilm therapy for chronic wounds. *Int Wound J.* 2024 Feb;21(2):e14667.
155. Percival SL, Francolini I, Donelli G. Low-level laser therapy as an antimicrobial and antibiofilm technology and its relevance to wound healing. *Future Microbiol.* 2015;10:255–72. doi: 10.2217/fmb.14.109.
156. Halstead FD, Thwaite JE, Burt R, et al. Antibacterial activity of blue light against nosocomial wound pathogens growing planktonically and as mature biofilms. *Appl Environ Microbiol.* 2016;82(13):4006–16. doi: 10.1128/AEM.00756-16.
157. Xiao Y, Zou H, Li J, Song T, Lv W, Wang W, Wang Z, Tao S. Impact of quorum sensing signaling molecules in gram-negative bacteria on host cells: current understanding and future perspectives. *Gut Microbes.* 2022;14(1):2039048. doi: 10.1080/19490976.2022.2039048.
158. Ammons MC. Anti-biofilm strategies and the need for innovations in wound care. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov.* 2010;5(1):10–7.

159. Caplin JD, García AJ. Implantable antimicrobial biomaterials for local drug delivery in bone infection models. *Acta Biomater.* 2019;15(93):2–11. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.01.015>.
160. Wang H, Chu W, Ye C, Gaeta B, Tao H, Wang M, Qiu Z, Wang M. Chlorogenic acid attenuates virulence factors and pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa* by regulating quorum sensing. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2018;103:903–15. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9482-7>.
161. Dell'Acqua G, Giacometti A, Cirioni O, Ghiselli R, Saba V, Scalise G, Gov Y, Balaban N. Suppression of drug-resistant staphylococcal infections by the quorum-sensing inhibitor RNAIII-Inhibiting Peptide. *J Infect Dis.* 2004;190:318–20. <https://doi.org/10.1086/386546>.
162. Simonetti O, Cirioni O, Cacciatore I, Baldassarre L, Orlando F, Pierpaoli E, Lucarini G, Orsetti E, Provinciali M, Fornasari E, et al. Efficacy of the Quorum Sensing Inhibitor FS10 Alone and in Combination with Tigecycline in an Animal Model of Staphylococcal Infected Wound. *PLoS ONE.* 2016;11:e0151956. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151956>.
163. Fong J, Mortensen KT, Nørskov A, Qvortrup K, Yang L, Tan CH, Nielsen TE, Givskov M. Itaconimides as Novel Quorum Sensing Inhibitors of *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Cell Infect Microbiol.* 2019;8:443. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00443>.
164. Zhang Y, Sass A, Van Acker H, Wille J, Verhasselt B, Van Nieuwerburgh F, Kaefer V, Crabbé A, Coenye T. Coumarin reduces virulence and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* by affecting quorum sensing, type III secretion and C-di-GMP levels. *Front Microbiol.* 2018. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01952>.
165. Dai C, Lin J, Li H, Shen Z, Wang Y, Velkov T, Shen J. The Natural product curcumin as an antibacterial agent: current achievements and problems. *Antioxidants.* 2022;11(3):459. <https://doi.org/10.3390/antiox11030459>.
166. Baldassarre L, Fornasari E, Cornacchia C, Cirioni O, Silvestri C, Castelli P, Giacometti A, Cacciatore I. Discovery of novel RIP derivatives by alanine scanning for the treatment of *S. aureus* infections. *Med Chem Commun.* 2013;4:1114. <https://doi.org/10.1039/c3md00122a>.
167. Tetz GV, Artemenko NK, Tetz VV. Effect of DNase and antibiotics on biofilm characteristics. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53:1204–9. <https://doi.org/10.1128/AAC.00471-08>.
168. Kalpana BJ, Aarthy S, Pandian SK. Antibiofilm activity of α -amylase from *Bacillus subtilis* S8–18 against biofilm forming human bacterial pathogens. *Appl Biochem Biotechnol.* 2012;167(6):1778–94. <https://doi.org/10.1007/s12010-011-9526-2>.

169. Luo Y, Yang Q, Zhang D, Yan W. Mechanisms and control strategies of antibiotic resistance in pathological biofilms. *J Microbiol Biotechnol.* 2021;31(1):1–7. <https://doi.org/10.4014/jmb.2010.10021>.
170. Huan Y, Kong Q, Mou H, Yi H. Antimicrobial peptides: classification, design, application and research progress in multiple fields. *Front Microbiol.* 2020;11:582779. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.582779>.
171. Torres MDT, Sothiselvam S, Lu TK, de la Fuente-Nunez C. Peptide design principles for antimicrobial applications. *J Mol Biol.* 2019;431(18):3547–67. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2018.12.015>.
172. Roberts G, Hammad L, Creevy J, Shearman C, Mani R. Physical changes in dermal tissues around chronic venous ulcers. In: *Proceedings of the 7th European Conference on Advances in Wound Management*; 1997 Nov 18–20. Harrogate: European Wound Management Association, 1997:104–5.
173. Leveen H, Falk G, Borek B, Diaz C, Lynfield Y, Wynkoop B, et al. Chemical acidification of wounds An adjuvant to healing and the unfavourable action of alkalinity and ammonia. *Ann Surg.* 1973;178:745–50.
174. Kaufman T, Eichenlaub EH, Angel MF, Levin M, Futrell JW. Topical acidification promotes healing of experimental deep partial thickness skin burns: a randomised double-blind preliminary study. *Burns.* 1985;12:84–90.
175. Kot B, Sytykiewicz H, Sprawka I, Witeska M. Effect of manuka honey on biofilm-associated genes expression during methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm formation. *Sci Rep.* 2020;10(1):13552.
176. LuTheryn G, Glynne-Jones P, Webb JS, Carugo D. Ultrasound-mediated therapies for the treatment of biofilms in chronic wounds: a review of present knowledge. *Microb Biotechnol.* 2020;13(3):613–28. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13471>.
177. Kvich L, Christensen MH, Pierchala MK, Astafiev K, Lou-Moeller R, Bjarnsholt T. The Combination of Low-Frequency Ultrasound and Antibiotics Improves the Killing of In Vitro *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Antibiotics (Basel).* 2022;11(11):1494. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11111494>.
178. Hou Y, Yang M, Jiang H, Li D, Du Y. Effects of low-intensity and low-frequency ultrasound combined with tobramycin on biofilms of extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett.* 2019;366(3):026. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnz026>.
179. Agrawal KS, Sarda AV, Shrotriya R, Bachhav M, Puri V, Nataraj G. Acetic acid dressings: Finding the Holy Grail for infected wound management. *Indian J Plast Surg.* 2017;50(3):273–80. https://doi.org/10.4103/ijps.IJPS_245_16.
180. Madhusudhan VL. Efficacy of 1% acetic acid in the treatment of chronic wounds infected with *Pseudomonas aeruginosa*: prospective randomised controlled clinical trial. *Int Wound J.* 2016;13(6):1129–36. <https://doi.org/10.1111/iwj.12428>.

181. Wilson M, Henry M, Quill R, Byrne P. The pH of varicose ulcer surfaces and its relationship to healing. *VASA*. 1979;8:339–42.
182. Romanelli M, Schipani E, Piaggese A, Barachini P. Evaluation of surface pH on venous leg ulcers under Allevyn dressings. London: The Royal Society of Medicine Press; 1997.
183. Normandin S, Safran T, Winocour S, et al. Negative pressure wound therapy: mechanism of action and clinical applications. *Semin Plast Surg*. 2021;35(3):164–70. <https://doi.org/10.1055/s-0041-1731792>.
184. Ludolph I, Fried FW, Kneppel K, Arkudas A, Schmitz M, Horch RE. Negative pressure wound treatment with computer-controlled irrigation/instillation decreases bacterial load in contaminated wounds and facilitates wound closure. *Int Wound J*. 2018;15:978–84. <https://doi.org/10.1111/iwj.12958>.
185. Lam G, Fontaine R, Ross FL, Chiu ES. Hyperbaric oxygen therapy. *Adv Skin Wound Care*. 2017;30:181–90. <https://doi.org/10.1097/01.ASW.0000513089.75457>.
186. Sanford NE, Wilkinson JE, Nguyen H, Diaz G, Wolcott R. Efficacy of hyperbaric oxygen therapy in bacterial biofilm eradication. *J Wound Care*. 2018;27(Sup1):S20–8. <https://doi.org/10.12968/jowc.2018.27.Sup1.S20>.
187. Kolpen M, Lerche CJ, Kragh KN, Sams T, Koren K, Jensen AS, et al. Hyperbaric oxygen sensitizes anoxic *Pseudomonas aeruginosa* biofilm to ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017;61:e01024-17. <https://doi.org/10.1128/AAC.01024-17>.
188. Kant V, Gopal A, Kumar D, et al. Topical pluronic F-127 gel application enhances cutaneous wound healing in rats. *Acta Histochem*. 2014;116(1):5–13. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2013.04.010>.
189. Das GP, Math SS, Pandey P, Roy S. A surfactant polymer dressing potentiates antimicrobial efficacy in biofilm disruption. *Sci Rep*. 2018;8:873. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19175-7>.
190. Walencka E, Rózsalska S, Sadowska B, et al. The influence of *Lactobacillus acidophilus*-derived surfactants on staphylococcal adhesion and biofilm formation. *Folia Microbiol*. 2008;53(1):61–6.
191. Alcayaga-Miranda F, Cuenca J, Khoury M. Antimicrobial activity of mesenchymal stem cells: current status and new perspectives of antimicrobial peptide-based therapies. *Front Immunol*. 2017;8:339. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.0033>.
192. Johnson V, Webb T, Norman A, et al. Activated mesenchymal stem cells interact with antibiotics and host innate immune responses to control chronic bacterial infections. *Sci Rep*. 2017;7(1):9575. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08311-4>.
193. Wood CR, Al Dhahri D, Al Delfi I, et al. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem/stromal cells adhere to and inhibit the growth of

- Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Microbiol*. 2018;67(12):1789–95. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.00086>.
194. World Union of Wound Healing Societies (WUWHS). Management of Biofilm. Wounds International. 2016. Available from: <https://www.woundsinternational.com/resources/details/management-biofilm>
195. Schultz G, Bjarnsholt T, James GA, et al. Global Wound Biofilm Expert Panel consensus guidelines for the identification and treatment of biofilms in chronic nonhealing wounds. *Wound Repair Regen*. 2017;25(5):744–57. <https://doi.org/10.1111/wrr.12590>.
196. Dowsett C. Biofilms: a practice-based approach to identification and treatment. *Wounds UK*. 2013;9(2):68–72.
197. Cusumano CK, Pinkner JS, Han Z, et al. Treatment and prevention of urinary tract infection with orally active FimH inhibitors. *Sci Transl Med*. 2011;3(109):109ra115.
198. Chorell E, Pinkner JS, Phan G, et al. Design and synthesis of pilicides with increased antivirulence activity. *J Med Chem*. 2010;53(15):5690–5.
199. Cegelski L, Marshall GR, Eldridge GR, Hultgren SJ. The biology and future prospects of antivirulence therapies. *Nat Rev Microbiol*. 2008;6(1):17–27. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1818>.
200. Cegelski L, Pinkner JS, Hammer ND, et al. Small-molecule inhibitors target *Escherichia coli* amyloid biogenesis and biofilm formation. *Nat Chem Biol*. 2009;5(12):913–9. <https://doi.org/10.1038/nchembio.242>.
201. Finnegan S, Percival SL. EDTA: an antimicrobial and antibiofilm agent for use in wound care. *Adv Wound Care*. 2015;4(7):415–21. <https://doi.org/10.1089/wound.2014.0577>.
202. Cooper R, Jenkins L, Hooper S. Inhibition of biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* by Medihoney in vitro. *J Wound Care*. 2014;23(3):93–104.
203. Wolcott R. Disrupting the biofilm matrix improves wound outcomes. *J Wound Care*. 2015;24(8):366–71.
204. Cava F, Lam H, de Pedro MA, Waldor MK. Emerging knowledge of regulatory roles of D-amino acids in bacteria. *Cell Mol Life Sci*. 2011;68(5):817–31. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0571-8>.
205. Kolodkin-Gal I, Cao S, Chai L, et al. A self-produced trigger for biofilm disassembly that targets exopolysaccharide. *Cell*. 2012;149(3):684–92. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.055>.
206. Thomas DC, Tsu CL, Nain RA, et al. The role of debridement in wound bed preparation in chronic wound: a narrative review. *Ann Med Surg*. 2021;71:102876. <https://doi.org/10.1016/j.amsu.2021.102876>.
207. Ramundo J, Gray M. Enzymatic wound debridement. *J Wound Ostomy Continence Nurs*. 2008;35(3):273–80. <https://doi.org/10.1097/01.WON.0000319125.21854.78>.

208. Boakye YD, Osafo N, Danquah CA, et al. Antimicrobial agents: antibacterial, antibiofilm natural compounds and chemicals. In: Kırmusaoğlu S, editor. *Antimicrobials, Antibiotic Resistance, Antibiofilm Strategies and Activity Methods*. London: IntechOpen; 2019.
209. Ciofu O, Rojo-Molinero E, Macià MD, Oliver A. Antibiotic treatment of biofilm infections. *APMIS*. 2017;125(4):304–19. <https://doi.org/10.1111/apm.12673>.
210. Malone M, Goeres DM, Gosbell IB, et al. Approaches to biofilm-associated infections: need for standardized biofilm methods. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2017;15(2):147–56. <https://doi.org/10.1080/14787210.2017.1262257>.
211. Castaneda P, McLaren A, Tavaziva G, Overstreet D. Biofilm antimicrobial susceptibility increases with exposure time. *Clin Orthop Relat Res*. 2016;474(7):1659–64. <https://doi.org/10.1007/s11999-016-4700-z>.
212. Wolcott R, Dowd S. The role of biofilms: are we hitting the right target? *Plast Reconstr Surg*. 2011;127(Suppl 1):28S–35S. <https://doi.org/10.1097/PRS.0b013e3181fca244>.
213. Ciofu O, Moser C, Jensen PØ, Høiby N. Tolerance and resistance of microbial biofilms. *Nat Rev Microbiol*. 2022;20(10):621–35. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00682-4>.
214. De Beer D, Srinivasan R, Stewart PS. Direct measurement of chlorine penetration into biofilms. *Appl Environ Microbiol*. 1994;60(12):4339–44. <https://doi.org/10.1128/aem.60.12.4339-4344.1994>.
215. Dunne WM Jr, Mason EO Jr, Kaplan SL. Diffusion of rifampin and vancomycin through a *Staphylococcus epidermidis* biofilm. *Antimicrob Agents Chemother*. 1993;37(12):2522–6. <https://doi.org/10.1128/AAC.37.12.2522>.
216. Anderl JN, Franklin MJ, Stewart PS. Antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44(7):1818–24. <https://doi.org/10.1128/AAC.44.7.1818-1824.2000>.
217. Brown MR, Allison DG, Gilbert P. Resistance of bacterial biofilms to antibiotics: a growth-rate related effect? *J Antimicrob Chemother*. 1988;22(6):777–80. <https://doi.org/10.1093/jac/22.6.777>.
218. Evans DJ, Allison DG, Brown MR, Gilbert P. Susceptibility of biofilms to ciprofloxacin: effect of specific growth rate. *J Antimicrob Chemother*. 1991;27:177–84.
219. Duguid IG, Evans E, Brown MR, Gilbert P. Growth-rate-independent killing by ciprofloxacin of biofilm-derived *Staphylococcus epidermidis*. *J Antimicrob Chemother*. 1992;30(6):791–802.
220. Duguid IG, Evans E, Brown MR, Gilbert P. Effect of biofilm culture on *Staphylococcus epidermidis* susceptibility to tobramycin. *J Antimicrob Chemother*. 1992;30(6):803–10.
221. Brown MR, Barker J. Protozoa and biofilms: unexplored pathogen reservoirs. *Trends Microbiol*. 1999;7:46–50.

222. Hengge-Aronis R. Regulation of gene expression during entry into stationary phase. In: Neidhardt FC, editor. *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*. Washington: ASM Press; 1996. p.1497–512.
223. Adams JL, McLean RJ. Impact of rpoS deletion on *Escherichia coli* biofilms. *Appl Environ Microbiol*. 1999;65(9):4285–7.
<https://doi.org/10.1128/AEM.65.9.4285-4287.1999>.
224. Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, et al. Cell-to-cell signals in bacterial biofilm development. *Science*. 1998;280(5361):295–8.
<https://doi.org/10.1126/science.280.5361.295>.
225. Brooun A, Liu S, Lewis K. Dose-response study of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44(3):640–6. <https://doi.org/10.1128/AAC.44.3.640-646.2000>.
226. Maira-Litran T, Allison DG, Gilbert P. Role of mar and acrAB in ciprofloxacin resistance in *Escherichia coli* biofilms. *J Antimicrob Chemother*. 2000; 45:789–95.
227. Jaffe A, Bush K, Dewald M, et al. Role of OmpF and OmpC porins in β -lactam permeation. *Antimicrob Agents Chemother*. 1982; 22:942–8.
228. Prigent-Combaret C, Vidal O, Dorel C, Lejeune P. Abiotic surface sensing in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 1999; 181:5993–6002.
229. Watters C, Fleming D, Bishop D, Rumbaugh KP. Host responses to biofilm. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2016; 142:193–239.
<https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2016.05.007>.
230. Breskovska H. Efektot na hiperbarnata oksigenoterapija kako adjuvantna terapija vo zazdravuvanjeto na hronichnite rani. Skopje:UKIM;2020
231. Eriksson E, Liu PY, Schultz GS, et al. Chronic wounds: Treatment consensus. *Wound Rep Reg*. 2022; 30 (2): 156- 171. doi:10.1111/wrr.12994
232. Reisner BS, Woods GL, Jr RB, Larone DH, Garcia LS, Shimiz R. General issues in clinical microbiology: general processing. *Manual of Clinical Microbiology*. 1999; 64-104.
233. O'Hara CM, Weinstein MP, Miller JM. Manual and automated systems for detection and identification of microorganisms. 2003;11:193-201.
234. Foxman B. Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs. *Dis Mon*. 2003; 49(2): 53-70.
235. Christensen GD, Simpson WA, Bismo AL, Beachery EH. The adherence of the slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infect immune*. 1982; 37:318–26
236. Stepanovic S, Vukovic D, Hola V, Bonaventura G, Djukic S, Irkovic IC et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS*. 2007; 71 (5): 687-690
237. Olsson M, Järbrink K, Divakar U et al. The humanistic and economic burden of chronic wounds: a systematic review. *Wound Repair Regen*. 2019; 27:114–25.

238. Graves N, Phillips CJ, Harding K. A narrative review of the epidemiology and economics of chronic wounds. *British Journal of Dermatology*. 2022; 187(2): 141-148 DOI 10.1111/bjd.20692
239. Carter MJ, DaVanzo J, Haught R, Nusgart M, Cartwright D, Fife CE. Chronic wound prevalence and the associated cost of treatment in Medicare beneficiaries: changes between 2014 and 2019. *Journal of Medical Economics*. 2023; 26(1): 894–901.
240. Morasek K, Himmelsbach R, Schneider C, Ritschl V, Wieser S, Pötscher A, Stamm T. Prevalence and incidence of chronic wounds in Austria - a population-based real-world data analysis. *European Journal of Public Health*. 2024;34(3):ckae144.1498. <https://doi.org/10.1093/eurpub/ckae144.1498>
241. Kuikko K, Salmi T, Huhtala H, Kimpimäki T. Characteristics of chronic ulcer patients by gender and ulcer aetiology from a multidisciplinary wound centre. *Int Wound J*. 2024 Aug;21(8):e70012. doi: 10.1111/iwj.70012. PMID: 39107919; PMCID: PMC11303263.
242. Forssgren A, Nelzén O. Changes in the aetiological spectrum of leg ulcers after a broad-scale intervention in a defined geographical population in Sweden. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2012;44(5):498-503.
243. Apollonio A, Antignani PL, Di Salvo M, et al. A large Italian observational multicentre study on vascular ulcers of the lower limbs (Studio Ulcere Vascolari). *Int Wound J*. 2016;13(1):27-34.
244. Jockenhöfer F, Gollnick H, Herberger K, et al. Aetiology, comorbidities and cofactors of chronic leg ulcers: retrospective evaluation of 1 000 patients from 10 specialised dermatological wound care centers in Germany. *Int Wound J*. 2016; 13(5): 821-828.
245. Kelly M, Gethin G. Prevalence of chronic illness and risk factors for chronic illness among patients with venous leg ulceration: a cross-sectional study. *Int J Low Extrem Wounds*. 2019; 18(3): 301-308.
246. Zhou JQ, Huang LF, Lu YC et al. Prevalence and prognosis of hard-to-heal wounds with comorbidities in China. *J Wound Care*. 2022; 31: S7-S15.
247. Morat NS, Ajemi A. Prevalence and clinical characteristics of wound care patients in the northernmost state hospital of Malaysia: a retrospective analysis. *Wounds APAC*. 2024; 07(02): 6-9.
248. Bessa LJ, Fazii P, Di Giulio M, Cellini L. Bacterial isolates from infected wounds and their antibiotic susceptibility pattern: some remarks about wound infection. *Int Wound J*. 2015 Feb; 12(1):47-52.
249. Bowler PG, Davies BJ. The microbiology of infected and noninfected leg ulcers. *Int J Dermatol* 1999;38:573–8. [DOI] [PubMed] [Google Scholar]
250. Brook I, Frazier EH. Aerobic and anaerobic microbiology of chronic venous ulcers. *Int J Dermatol* 1998;37:426–8. [DOI] [PubMed] [Google Scholar]

251. Gjødsbøl K, Christensen JJ, Karlsmark T, Jørgensen B, Klein BM, Krogfelt KA. Multiple bacterial species reside in chronic wounds: a longitudinal study. *Int Wound J* 2006;3:225–31. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
252. Davies CE, Hill KE, Wilson MJ, Stephens P, Hill CM, Harding KG, Thomas DW. Use of 16S ribosomal DNA PCR and denaturing gradient gel electrophoresis for analysis of the microfloras of healing and nonhealing chronic venous leg ulcers. *J Clin Microbiol* 2004;42:3549–57. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
253. Urbancic-Rovan V, Gubina M. Bacteria in superficial diabetic foot ulcers. *Diabet Med* 2000;17:814–5. [DOI] [PubMed] [Google Scholar]
254. Körber A, Schmid EN, Buer J, Klode J, Schadendorf D, Dissemmond J. Bacterial colonization of chronic leg ulcers: current results compared with data 5 years ago in a specialized dermatology department. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2010;24:1017–25. [DOI] [PubMed] [Google Scholar]
255. Halbert AR, Stacey MC, Rohr JB, Jopp-McKay A. The effect of bacterial colonization on venous leg ulcer healing. *Australas J Dermatol* 1992;33:75–80. [DOI] [PubMed] [Google Scholar]
256. Madsen SM, Westh H, Danielsen L, Rosdahl VT. Bacterial colonization and healing of venous leg ulcers. *APMIS* 1996;104:895–9. [DOI] [PubMed] [Google Scholar]
257. Burmølle M, Thomsen TR, Fazli M, Dige I, Christensen L, Homøe P, Tvede M, Nyvad B, Tolker-Nielsen T, Givskov M, Moser C, Kirketerp-Møller K, Johansen HK, Høiby N, Jensen PØ, Sørensen SJ, Bjørnsholt T. Biofilms in chronic infections – a matter of opportunity – monospecies biofilms in multispecies infections. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2010;59:324–36.
258. Jockenhöfer F, Gollnick H, Herberger K, Isbary G, Renner R, Stücker M et al. Bacteriological pathogen spectrum of chronic leg ulcers: Results of a multicenter trial in dermatologic wound care centers differentiated by regions. *JDDG: Journal Der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*. 2013; 11(11): 1057–1063. doi:10.1111/ddg.12170
259. Ahmed EF, Rasmi AH, Darwish AA et al. Prevalence and resistance profile of bacteria isolated from wound infections among a group of patients in upper Egypt: a descriptive cross-sectional study. *BMC Res Notes* 16; 2023: 106. <https://doi.org/10.1186/s13104-023-06379-y>
260. Hassan MA, Abd El-Aziz S, Elbadry HM, Samy A, Tamer TM. Prevalence, antimicrobial resistance profile, and characterization of multi-drug resistant bacteria from various infected wounds in North Egypt. *Saudi J Biol Sci.* 2022;
261. Asres G, Legese M, Woldearegay G. Prevalence of multidrug resistant Bacteria in postoperative wound infections at Tikur Anbessa specialized hospital, Addis Ababa, Ethiopia. *Arch Med.* 2017;9(4):12.

262. Upreti N, Rayamajhee B, Sherchan SP, Choudhari MK, Banjara MR. Prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, multidrug resistant and extended spectrum beta-lactamase producing gram negative bacilli causing wound infections at a tertiary care hospital of Nepal. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2018; 7: 121.
263. Puca V, Marulli RZ, Grande R, Vitale I, Niro A, Molinaro G et al. Microbial Species Isolated from Infected Wounds and Antimicrobial Resistance Analysis: Data Emerging from a Three-Years Retrospective Study. *Antibiotics (Basel)*. 2021 Sep 24;10(10):1162. doi: 10.3390/antibiotics10101162. PMID: 34680743; PMCID: PMC8532735.
264. Guan H., Dong W., Lu Y., Jiang M., Zhang D., Aobuliximu Y., Dong J., Niu Y., Liu Y., Guan B., et al. Distribution and Antibiotic Resistance Patterns of Pathogenic Bacteria in Patients With Chronic Cutaneous Wounds in China. *Front. Med. (Lausanne)* 2021; 17: 609584.
265. Rahim K., Saleha S., Zhu X., Huo L., Basit A., Franco O.L. Bacterial contribution in chronicity of wounds. *Microb. Ecol*. 2017; 73: 710–721.
266. Wu YK, Cheng NC, Cheng CM. Biofilms in chronic wounds: Pathogenesis and diagnosis. *Trends Biotechnol*. 2019;37:505–517. doi: 10.1016/j.tibtech.2018.10.011.
267. Moges F, Eshetie S, Abebe W, Mekonnen F, Dagnew M, Endale A et al. High prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing Gram-negative pathogens from patients attending Felege Hiwot Comprehensive Specialized Hospital, Bahir Dar, Amhara region. *PLoS ONE*. 2019; 14(4): e0215177.
268. Cavallo I, Sivori F, Mastrofrancesco A, Abril E, Pontone M, Di Domenico EG et al. Bacterial Biofilm in Chronic Wounds and Possible Therapeutic Approaches. *Biology (Basel)*. 2024 Feb 9;13(2):109. doi: 10.3390/biology13020109. PMID: 38392327; PMCID: PMC10886835.
269. Howell-Jones R.S., Wilson M.J., Hill K.E., Howard A.J., Price P.E., Thomas D.W. A review of the microbiology, antibiotic usage and resistance in chronic skin wounds. *J. Antimicrob. Chemother*. 2005; 55: 143–149. doi: 10.1093/jac/dkh513.
270. Sahle B, Merid Y. Prevalence and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* in wound infections: a hospital study in Hawassa, Ethiopia. *The journal of infection in developing countries*. 2024; 18(10): 1530-1538
271. Kulayta K, Zerdo Z, Seid M et al. Biofilm formation and antibiogram profile of bacteria from infected wounds in a general hospital in southern Ethiopia. *Sci Rep*. 2024; 14: 26359
272. Serra R, Grande R, Butrico L, Rossi A, Settimio UF, Caroleo B et al. Chronic wound infections: the role of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*. 2015;13(5): 605–613. <https://doi.org/10.1586/14787210.2015.1023291>

273. Price LB, Liu CM, Frankel YM, Melendez JH, Aziz M, Buchhagen J, Contente-Cuomo T et al. Macroscale spatial variation in chronic wound microbiota: a cross-sectional study. *Wound Repair Regen.* 2011 Jan-Feb;19(1):80-8.
274. Giacometti A. et al. Epidemiology and microbiology of surgical wound infections. *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38 (2): 918–922.
275. Tentolouris N, Jude EB, Smirnof I, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an increasing problem in a diabetic foot clinic. *Diabet Med.* 1999; 16 (9): 767-71
276. Dang CN, Prasad YD, Boulton AJ, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the diabetic foot clinic: a worsening problem. *Diabet Med* 2003; 20 (2): 159-6
277. Candel Gonzalez FJ, Alramadan M, Matesanz M, et al. Infections in diabetic foot ulcers. *Eur J Intern Med* 2003; 14(5): 341-3
278. Martinez-Gomez Dde A, Ramirez-Almagro C, Campillo-Soto A, et al. Diabetic foot infections: prevalence and antibiotic sensitivity of the causative microorganisms. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2009; 27 (6): 317-21
279. Citron DM, Goldstein EJ, Merriam CV, et al. Bacteriology of moderate-to-severe diabetic foot infections and in vitro activity of antimicrobial agents. *J Clin Microbiol* 2007; 45(9): 2819-28
280. Richard JL, Sotto A, Jourdan N, et al. Risk factors and healing impact of multidrug-resistant bacteria in diabetic foot ulcers. *Diabetes Metab* 2008; 34 (4 Pt 1): 363-9
281. Hartemann-Heurtier A, Robert J, Jacqueminet S, et al. Diabetic foot ulcer and multidrug-resistant organisms: risk factors and impact. *Diabet Med* 2004; 21 (7): 710-5
282. World Health Organization (2014) Antimicrobial resistance global report on surveillance. Available: <https://iris.who.int/handle/10665/112642>. Accessed: 15 January, 2023.
283. Saeed A, Ahsan F, Nawaz M, Iqbal K, Rehman KU, Ijaz T. Incidence of vancomycin resistant phenotype of the methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from a tertiary care hospital in Lahore. *Antibiotics (Basel).* 2019; 9: 3.
284. Lee AS, de Lencastre H, Garau J, Kluytmans J, Malhotra-Kumar S, Peschel A, Harbarth S. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nat Rev Dis Primers.* 2018; 4: 18033.
285. Wangai FK, Masika MM, Maritim MC, Seaton RA. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in East Africa: red alert or red herring? *BMC Infect Dis.* 2019; 19: 596.
286. Phan S, Feng CH, Huang R, Lee ZX, Moua Y, Phung OJ, Lenhard JR. Relative Abundance and Detection of *Pseudomonas aeruginosa* from Chronic Wound Infections Globally. *Microorganisms.* 2023; 11(5):1210.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms11051210>

287. Manikandan C, Amsath A. Antibiotic susceptibility of bacterial strains isolated from wound infection patients in Pattukkottai, Tamilnadu, India. *Int J Curr Microbiol App Sci.* 2013; 2(6): 195–203.
288. Fahim NAE. Prevalence and antimicrobial susceptibility profile of multidrug-resistant bacteria among intensive care units patients at Ain Shams University Hospitals in Egypt-a retrospective study. *J Egypt Public Health Assoc.* 2021;96(1):7.
289. Mama M, Abdissa A, Sewunet T. Antimicrobial susceptibility pattern of bacterial isolates from wound infection and their sensitivity to alternative topical agents at Jimma University Specialized Hospital, South-West Ethiopia. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2014; 13: 14.
290. Guan H, Dong W, Lu Y, Jiang M, Zhang D, Aobuliximu Y et al. Distribution and Antibiotic Resistance Patterns of Pathogenic Bacteria in Patients With Chronic Cutaneous Wounds in China. *Front Med (Lausanne).* 2021 Mar 17;8:609584.
291. Călina D, Docea AO, Rosu L, Zlatian O, Rosu AF, Anghelina F, Rogoveanu O et al. Antimicrobial resistance development following surgical site infections. *Mol Med Rep.* 2017 Feb;15(2):681-688.
292. Versey Z, da Cruz Nizer WS, Russell E, Zigic S, DeZeeuw KG, Marek JE et al. Biofilm-Innate Immune Interface: Contribution to Chronic Wound Formation. *Front. Immunol.* 2021; 12: 648554.
293. Neopane P, Nepal HP, Shrestha R, Uehara O, Abiko Y. In vitro biofilm formation by *Staphylococcus aureus* isolated from wounds of hospital-admitted patients and their association with antimicrobial resistance. *Int. J. Gen. Med.* 2018; 11: 25–32.
294. Asaad A, Ansari S, Ajlan SE, Awad SM. Epidemiology of Biofilm Producing *Acinetobacter baumannii* Nosocomial Isolates from a Tertiary Care Hospital in Egypt: A Cross-Sectional Study. *Infect Drug Resist.* 2021; 14: 709–717.
295. Di Domenico et al. Biofilm is a Major Virulence Determinant in Bacterial Colonization of Chronic Skin Ulcers Independently from the Multidrug Resistant Phenotype. *International Journal of Molecular Sciences.* 2017;18(5): 1077. <https://doi.org/10.3390/ijms18051077>
296. Malone M et al. The prevalence of biofilms in chronic wounds: a systematic review and meta-analysis of published data. *J. Wound Care.* 2017; 26 (1): 20–25.
297. James GA, Swogger E, Wolcott R, Pulcini ED, Secor P, Sestrich J et al. Biofilms in chronic wounds. *Wound Repair Regen.* 2008; 16: 37–44.
298. Fazli M, Bjarnsholt T, Kirketerp-Møller K, Jørgensen B, Andersen AS, Krogfelt KA et al. Nonrandom distribution of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* in chronic wounds. *J. Clin. Microbiol.* 2009; 47: 4084–4089.
299. Kirketerp-Møller K, Jensen PØ, Fazli M, Madsen KG, Pedersen J, Moser C et al. Distribution, organization, and ecology of bacteria in chronic wounds. *J. Clin. Microbiol.* 2008, 46, 2717–2722.

300. Attinger C, Wolcott R. Clinically addressing biofilm in chronic wounds. *Adv. Wound Care (New Rochelle)*. 2012; 1: 127–132.
301. Fazli M, Bjarnsholt T, Kirketerp-Møller K, Jørgensen A, Andersen CB, Givskov M et al. Quantitative analysis of the cellular inflammatory response against biofilm bacteria in chronic wounds. *Wound Repair Regen*. 2011; 19: 387–391.
302. Abdulhaq N, Nawaz Z, Zahoor MA, Siddique AB. Association of biofilm formation with multi drug resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *EXCLI J*. 2020; 19: 201–208.
303. Rahim K, Quasim M, Rahman H, Khan TA, Ahmad I, Khan A et al. Antimicrobial resistance among aerobic biofilm producing bacteria isolated from chronic wounds in the tertiary care hospitals of Peshawar, Pakistan. *Journal of Wound Care*. 2016; 25(8):0969-0700.
304. Hassan M, Kjos M, Nes IF, Diep DB, Lotfipour F. Natural antimicrobial peptides from bacteria: characteristics and potential applications to fight against antibiotic resistance. *J App Microbiol*. 2012; 23:1365–2672.
305. Ratajczak M, Kamińska D, Nowak-Malczewska DM, Schneider A, Długaszevska J. Relationship between antibiotic resistance, biofilm formation, genes coding virulence factors and source of origin of *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains. *Ann Agric Environ Med*. 2021 Jun 14;28(2):306-313.
306. Olejnízková K, Holá V. The comparison of selected virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* catheter isolates. *Epidemiol Mikrobiol Imunol*. 2012; 61: 21–8.
307. Lima JLDC, Alves LR, Jacomé PRLA, Bezerra Neto JP, Maciel MAV, Morais MMC. Biofilm production by clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and structural changes in LasR protein of isolates non biofilm-producing. *Braz J Infect Dis*. 2018; 22: 129–136.
308. Da Silva Carvalho T, Rodrigues Perez LR. Impact of biofilm production on polymyxin B susceptibility among *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2019; 40: 739–740.
309. Kamali E, Jamali A, Ardebili A et al. Evaluation of antimicrobial resistance, biofilm forming potential, and the presence of biofilm-related genes among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Res Notes*. 2020; 13: 27
310. Chimi LY, Noubom M, Bisso BN, Njateng GSS, Dzoyem JP. Biofilm Formation, Pyocyanin Production, and Antibiotic Resistance Profile of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Wounds. *International Journal of Microbiology*. 2024;
311. Jabalameli F, Mirsalehian A, Khoramian B, Aligholi M, Khoramrooz SS, Asadollahi P. et al. Evaluation of biofilm production and characterization of genes encoding type III secretion system among *pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients. *Burns*. 2012; 38(8): 1192–1197.

312. Ma Q, Wood TK. OmpA influences escherichia coli biofilm formation by repressing cellulose production through the CpxRA two-component system. *Environmental Microbiology*. 2009; 11(10): 2735–2746.
313. Vasiljević Z, Jovčić B, Ćirković I, Đukić S. An examination of potential differences in biofilm production among different genotypes of *Pseudomonas aeruginosa*. *Arch Biol Sci*. 2014;66:117–21. doi: 10.2298/ABS1401117V.
314. Milojković M, Nenadović Ž, Stanković S, Božić DD, Nedeljković NS, Ćirković I et al. Phenotypic and genetic properties of susceptible and multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Southern Serbia. *Arh Hig Rada Toksikol*. 2020 Oct 6;71(3):231-250. doi: 10.2478/aiht-2020-71-3418. PMID: 33074173; PMCID: PMC7968503.
315. Puja N, Nepal HP, Shrestha R, Uehara O, Abiko Y. In vitro biofilm formation by *Staphylococcus aureus* isolated from wounds of hospital-admitted patients and their association with antimicrobial resistance. *International Journal of General Medicine*. 2018;25-32.
316. Banerjee B, Gowda P, Ananda KT. Biofilm Formation and Antibiotic Resistance of *S. aureus* Strains isolated from Chronic Traumatic Wounds. *J Pure Appl Microbiol*. 2022;16(1):424-429.
317. Swarna SR, Swetha, Gomathi S. Biofilm Production in Carbapenem Resistant Isolates from Chronic Wound Infections. *International Journal of Medical Research & Health Sciences*. 2017; 6(2): 61-67.
318. World Health Organization (2022) Global antimicrobial resistance and use surveillance system report. Available: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240062702>. Accessed: 15 June, 2023.
319. Budzyńska A, Skowron K, Kaczmarek A, Wietlicka-Piszc M, Gospodarek-Komkowska E. Virulence Factor Genes and Antimicrobial Susceptibility of *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Blood and Chronic Wounds. *Toxins (Basel)*. 2021 Jul 14;13(7):491.
320. Kahsay A, Mihret A, Abebe T, Andualem T. Isolation and antimicrobial susceptibility pattern of *Staphylococcus aureus* in patients with surgical site infection at Debre Markos Referral Hospital, Amhara Region, Ethiopia. *Arch Public Health*. 2014; 72: 16.
321. Tsige Y, Tadesse S, T GE, Tefera MM, Amsalu A, Menberu MA et al. Prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* and associated risk factors among patients with wound infection at Referral Hospital, Northeast Ethiopia. *J Pathog*. 2020: 3168325.
322. Horne KC, Howden BP, Grabsch EA, Graham M, Ward PB, Xie S, Mayall BC, Johnson PDR, Grayson ML. Prospective Comparison of the Clinical Impacts of Heterogeneous Vancomycin-Intermediate Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and Vancomycin-Susceptible MRSA. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(8).

323. Raza M, Chander A, Ranabhat A. Antimicrobial susceptibility patterns of the bacterial isolates in post-operative wound infections in a tertiary care hospital, Kathmandu, Nepal. *Open J Medi Microbiol*. 2013; 3: 159–163.
324. Seyoum G (2015) Multidrug resistant bacteria in postoperative wound infection at Tikur Anbessa Specialized Hospital, Addis Ababa, Ethiopia. Available: <http://etd.aau.edu.et/handle/123456789/4871>. Accessed: 5 March, 2023.
325. Moazami GS, Eftekhari F. Multidrug resistance and integron carriage in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Tehran, Iran. *Turkish Journal of Medical Sciences*. 2015; 45(4): 789–793.
326. De Francesco MA, Ravizzola G, Peroni L, Bonfanti C, Manca N. Prevalence of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* in an Italian hospital. *Journal of Infection and Public Health*. 2013; 6(3): 179–185.
327. European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance of Antimicrobial Resistance in Europe 2017. <https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/surveillance-antimicrobial-resistance-europe-2017>. Accessed 15 Nov 2018.
328. Vaez H, Salehi-Abargouei A, Ghalehnoo ZR, Khademi F. Multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Iran: a systematic review and metaanalysis. *J Glob Infect Dis*. 2018;10(4):212–7.
329. Isyaka MT, Ibrahim MM, Umoru AM, Umar JB, Bukar MA, Haruna AB et al. Infection of Wounds by Potential Bacterial Pathogens and Their Resistogram. *Open Access Library Journal*. 2019; 6(7): 1-13.
330. EARSS/EARS-Net & ECDC, 2011
331. Gardner SE, Hillis SL, Heilmann K, Segre JA, Grice EA. The neuropathic diabetic foot ulcer microbiome is associated with clinical factors. *Diabetes*. 2013;62(3):923–30.