

REZISTENȚA LA ANTIBIOTICE ȘI FORMAREA BIOFILMELOR DE CĂTRE TULPINILE DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS IZOLATE DIN ULCERE TROFICE

Greta BĂLAN,

IP Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie
Nicolae Testemițanu**Rezumat**

Rezistența în creștere a tulpinilor de *Staphylococcus aureus* la antibiotice, împreună cu rezistența inductibilă la clindamicină, rezistența la meticilină și formarea biofilmelor reprezintă probleme grave pentru terapia infecțiilor provocate de această specie. Au fost luate în studiu 53 de tulpini de *S. aureus* izolate din ulcere trofice. Toate tulpinile au fost identificate și testate conform ghidurilor în vigoare. Astfel, 36 (67,9%) de tulpini izolate din ulcere trofice au fost polirezistente la antibiotice, 23 (43,4%) au fost rezistente la meticilină (MRSA), 12 (22,6%) au fost pozitive prin testul D și 39 (73,6%) au produs biofilme. Tulpinile de *S. aureus* au prezentat sensibilitate mai mare față de vancomicină (100%) și linezolid (90,6%). Rată mai mare de rezistență inductibilă la clindamicină a fost observată în rândul MRSA, în comparație cu *S. aureus* sensibil la meticilină (MSSA). Similar, au fost înregistrate rate mai mari de polirezistență și rezistență la meticilină printre tulpinile producătoare de biofilm, comparativ cu cele care nu produc biofilm. Așadar, pentru un management bun al infecțiilor provocate de *S. aureus*, este important de inclus în diagnosticul de laborator de rutină testul D pentru detectarea rezistenței inductibile la clindamicină. Vancomicina și linezolidul sunt preparatele ce rămân a fi indicate în tratamentul empiric al infecțiilor severe cauzate de *S. aureus*. Detectarea producerii de biofilme de asemenea ar trebui inclusă în testele de rutină.

Cuvinte-cheie: *Staphylococcus aureus*, rezistență la antibiotice, biofilme, ulcere trofice

Summary

Antibiotic resistance and biofilm production of *Staphylococcus aureus* strains isolated from trophic ulcers

The increasing resistance of *Staphylococcus aureus* strains to antibiotics, along with the inducible resistance to clindamycin, methicillin resistance and biofilm formation are major problems in the management of infections caused by these bacteria. The study was conducted on 53 *S. aureus* strains isolated from trophic ulcers. All isolated strains were identified and tested according to the current guidelines. 36 (67,9%) of *S. aureus* strains isolated from trophic ulcers were polyresistant to antibiotics, 23 (43,4%) were methicillin resistant (MRSA), 12 (22,6%) were positive on D test and 39 (73,6%) produced biofilms. *S. aureus* strains showed greater sensitivity to vancomycin (100%) and linezolid (90,6%). A higher rate of inducible clindamycin resistance was found in MRSA compared to methicillin-sensitive *S. aureus* (MSSA). Similarly, higher rate of multidrug and methicillin resistance was recorded

among biofilm-producing strains compared to non-biofilm-producing strains. The D test should be included within the routine laboratory diagnosis for detecting inducible resistance, as well as for a proper management of infections caused by *S. aureus*. Vancomycin and linezolid are the antibiotics that are still indicated in the empirical treatment of severe infections caused by *S. aureus*. Moreover, detection of biofilm production should also be included in routine laboratory tests.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, resistance to antibiotics, biofilms, trophic ulcer

Резюме

Антибиотикорезистентность и образование биофильмов штаммов *Staphylococcus aureus*, выделенных из трофических язв

Повышенная резистентность штаммов *Staphylococcus aureus* к антибиотикам, наряду с индуцибельной устойчивостью к клиндамицину, резистентностью к метициллину и образованием биопленок, являются серьезными проблемами в терапии инфекций, вызываемых этим видом. В исследование были включены 53 штамма *S. aureus*, выделенных из трофических язв. Все выделенные штаммы были идентифицированы и протестированы в соответствии с действующими правилами. 36 (67,9%) штаммов *S. aureus* были полирезистентными к антибиотикам, 23 (43,4%) были устойчивыми к метициллину (MRSA), 12 (22,6%) были положительными по тесту D и 39 (73,6%) образовали биопленки. Штаммы *S. aureus* показали наибольшую чувствительность к ванкомицину (100%) и линезолиду (90,6%). Наибольшая скорость развития индуцибельной резистентности к клиндамицину наблюдалась у штаммов MRSA по сравнению с чувствительными к метициллину MRSA штаммами. Аналогично, более высокие показатели полирезистентности и устойчивости к метициллину были зарегистрированы среди штаммов, образующих биопленку, по сравнению с штаммами, не образующими биопленку. Для успешного контроля инфекций, вызванных *S. aureus*, важно включить в рутинную лабораторную диагностику тест D для выявления индуцибельной устойчивости к клиндамицину. Ванкомицин и линезолид являются препаратами, которые остаются в назначениях при эмпирическом лечении тяжелых инфекций, вызванных *S. aureus*. Определение формирования биопленки также должно быть включено в рутинные тесты.

Ключевые слова: *Staphylococcus aureus*, устойчивость к антибиотикам, биофильмы, трофические язвы

Introducere

Ulcerul trofic continuă să fie o problemă clinică majoră, acesta fiind considerat în prezent o afecțiune cu un puternic impact socioeconomic. Spitalizările persoanelor cu această boală sunt de durată și repetate, crescând exponențial cheltuielile pentru îngrijirile medicale, și sunt frecvente cazurile când se ajunge la invaliditate și pensionări premature pe caz de boală. Ulcerul trofic nu este considerat o boală aparte, ci o consecință a unei patologii mai grave [17]. Motivele pentru apariția ulcerului trofic sunt multiple: patologii care implică dereglarea fluxului sanguin prin vase, tulburări metabolice, leziuni de diverse etiologii la nivelul pielii. Cauzele și factorii ce determină apariția ulcerelor trofice sunt foarte diverse. Deși teoretic „punctul de plecare” al ulcerelor este extrem de variat, peste 95% din acestea sunt expresia insuficienței venoase cronice [14]. Tratamentul ulcerelor trofice este unul de durată și complex. Spre deosebire de plăgile obișnuite, vindecarea ulcerelor trofice se oprește în faza inflamatorie și nu progresează din cauza vârstei, infecțiilor asociate, ischemiei, diabetului zaharat, stărilor neoplazice, malnutriției etc. [11, 19].

Una dintre cele mai frecvente complicații ale ulcerului trofic este asocierea infecției microbiene. Spectrul etiologic al acestor infecții este divers și aproximativ 60% din ulcerurile trofice sunt infectate cu floră bacteriană mixtă. Chiar dacă unele bacterii implicate în infecție nu sunt patogene, asocierea multiplă a acestora determină o evoluție către colonizarea critică, însoțită de o evoluție lentă a vindecării [20].

Microorganismele izolate cel mai des din ulcerurile trofice sunt din genul *Staphylococcus*, urmate de germeni din familia *Enterobacteriaceae* sau de specia *Pseudomonas aeruginosa*. Mai rar se izolează streptococi hemolitici α sau β și bacterii anaerobe, mai ales din genurile *Clostridium* și *Bacteroides* [12].

Patologia infecțioasă provocată de acești germeni constituie o problemă de interes în contextul medicinei actuale, din cauza frecvenței ridicate de manifestare și a problemelor serioase de tratament pe care le ridică. O preocupare majoră legată de aceste microorganisme este faptul că ele pot forma biofilme. Celulele incluse în biofilmul microbial prezintă o înaltă rezistență la antibiotice, ceea ce face să existe subpopulații de supraviețuitori din populația microbială a biofilmului în proporție relativ mică, dar aceste câteva celule supraviețuitoare inițiază o stare de înaltă protecție. Succesul tratamentului ulcerelor trofice infectate depinde atât de sensibilitatea la antibiotice a tulpinilor implicate în proces, cât și de proprietățile de persistență a acestor germeni. Este

cunoscut faptul că potențialul de persistență al microorganismelor influențează durata de viabilitate a lor în macroorganism [18, 21].

Situarea stafilococilor pe primele locuri în apariția infecțiilor bacteriene, creșterea anuală a numărului de tulpini de stafilococi rezistenți la metilicilină și apariția unor tulpini rezistente la antibioticele antistafilococice de rezervă încadrează această patologie în rândul bolilor infecțioase emergente.

Scopul studiului realizat a fost cercetarea tulpinilor de *Staphylococcus aureus* izolate din ulcere trofice din punctul de vedere al rezistenței lor la antibiotice și al formării biofilmelor.

Material și metode

A fost studiată rezistența la antibiotice a 53 de tulpini de *Staphylococcus aureus* izolate din ulcere trofice. Produsele patologice au fost însămânțate pe medii de cultură selective și neselective, iar identificarea s-a făcut pe baza caracterelor de cultură, morfotinctoriale, a prezenței coagulazei și a proprietăților biochimice [10, 22]. Sensibilitatea la antibiotice a fost testată prin metoda difuzimetrică Kirby-Bauer și sistemul VITEK 2 COMPACT. Metodologia determinării și interpretarea sensibilității la antibiotice au fost realizate standardizat, respectând ghidurile EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) de testare la antibiotice [5]. Discurile cu antibiotice utilizate pentru testare au fost: cefoxitină (30 μ g), eritromicină (15 μ g), clindamicină (2 μ g), gentamicină (10 μ g), ciprofloxacina (5 μ g), linezolid (10 μ g), tetraciclină (30 μ g), cloramfenicol (30 μ g) și rifampicină (5 μ g). Tulpinile care au prezentat rezistență la trei sau mai multe grupe de antibiotice au fost considerate polirezistente [13]. Caracterul metilicilinorezistent sau metilicinosensibil al tulpinilor de *Staphylococcus aureus* a fost determinat în funcție de diametrul zonei de inhibiție create de discul cu cefoxitină (30 μ g), conform EUCAST: *S. aureus* sensibil la metilicilină (MSSA) dacă diametrul este de cel puțin 22 mm; *S. aureus* rezistent la metilicilină (MRSA) dacă este mai mic de 22 mm [4]. Rezistența inductibilă la clindamicină a fost detectată prin testul dublu disc (testul D). Discurile de eritromicină (15 μ g) și clindamicină (2 μ g) sunt plasate la o distanță de 12-20 mm măsurată de la marginile discurilor. În cazul aplatizării zonei de inhibiție din jurul discului de clindamicină (test D pozitiv), clindamicina se raportează ca rezistentă [2].

Producerea biofilmului de către tulpinile de *S. aureus* izolate din ulcere trofice a fost determinată cantitativ, utilizând metoda microtitrării [9]. În acest scop, într-o placă cu 96 de godeuri s-au adăugat 150 μ l bulion peptonat și 15 μ l de suspensie bacteriană,

ajustată la etalonul de turbiditate McFarland 0,5 (respectiv $1,5 \times 10^8$ UFC/ml), preparată anterior din culturi bacteriene de 18-24 de ore, cultivate pe geloză sânge 5%. Testările au fost efectuate în duplicat. Plăcile au fost acoperite și incubate aerobice timp de 24-48 de ore la temperatura de 37°C. Ulterior, pentru evaluarea gradului de aderență a tulpinilor testate la substratul inert, conținutul fiecărui godeu a fost înlăturat și clătit de cinci ori cu soluție fiziologică sterilă, fiind fixate cu metanol rece timp de cinci minute. După îndepărtarea metanolului, plăcuțele uscate au fost colorate timp de 30 minute cu soluție de cristal violet 0,1%. După colorare, excesul de colorant a fost spălat cu apă de robinet, iar biofilmul colorat a fost repus în suspensie cu o soluție de acid acetic glacial 33%. Suspensiile astfel obținute au fost utilizate pentru determinarea densității optice (DO), pe baza citirilor spectrofotometrice ale absorbanței suspensiilor colorate la 490 nm (A490).

Densitatea optică a cut-offului (ODc) este definită ca media DO a controlului negativ + 3x deviația standard (DS) a controlului negativ. Formarea biofilmului de către tulpinile testate a fost analizată și clasificată pe baza adsorbției colorantului cristal violet de către celule. Izolatele au fost clasificate în patru categorii: *neaderente*, cu densitate optică $<0,056$; *slab aderente* ($0,056 < DO \leq 0,112$); *moderat aderente* ($0,112 < DO \leq 0,222$) și *puternic aderente*, cu densitate optică $>0,222$.

Pentru controlul calității a fost utilizată tulpina de referință *S. aureus* ATCC 25923. Analiza statistică a datelor a fost efectuată cu ajutorul programului *EpilInfo 2000*.

Aspecte etice. Tulpinile utilizate în acest studiu au fost obținute din prelevatele clinice de rutină. Deoarece preluarea probelor nu a implicat contactul direct cu pacientul, consimțământul nu a fost necesar. Acest studiu a fost realizat cu aprobarea Comitetului de etică nr. 65/12.04.2017 al Universității de Stat de Medicină și Farmacie *Nicolae Testemițanu*, Republica Moldova.

Rezultate obținute

Dintre cele 53 de tulpini de *S. aureus* izolate din ulcere trofice, 36 (67,9%) au fost polirezistente la antibiotice, 23 (43,4%) au fost MRSA, 12 (22,6%) au fost pozitive prin testul D și 39 (73,6%) au produs biofilme.

Cel mai ridicat nivel de sensibilitate a tulpinilor de *S. aureus* a fost înregistrat față de vancomicină (100%), urmată de tetraciclină (92,4%), linezolid (90,6%) și cloramfenicol (88,6%), rezultatele fiind prezentate în tabelul 1.

Tabelul 1

Sensibilitatea la antibiotice a tulpinilor de S. aureus izolate din ulcere trofice

Antibioticul	MRSA (n=23)	MSSA (n=30)	Total (n=53)
Cefoxitină	0 (0%)	30 (100%)	30 (56,6%)
Ciprofloxacina	6 (26,1%)	9 (30%)	15 (28,3%)
Gentamicină	12 (52,2%)	22 (73,3%)	34 (64,1%)
Cloramfenicol	20 (86,9%)	27 (90%)	47 (88,6%)
Eritromicină	8 (34,8%)	16 (53,3%)	24 (45,3%)
Clindamicină	19 (82,6%)	26 (86,7%)	45 (84,9%)
Tetraciclină	21 (91,3%)	28 (93,3%)	49 (92,4%)
Linezolid	19 (82,6%)	29 (96,7%)	48 (90,6%)
Rifampicină	4 (17,39%)	13 (43,3%)	17 (32,1%)
Vancomicină	23 (100%)	30 (100%)	53 (100%)

Testarea sensibilității la antibiotice a tulpinilor de *S. aureus* a pus în evidență un număr mare de tulpini cu antibioretistență multiplă, iar 7 (13,2%) tulpini din cele 53 au fost sensibile la toate antibioticele testate.

Din 53 de tulpini de *S. aureus* testate, 12 (22,6%) au prezentat rezistență MLS_B inductibilă (macrolide-lincosamide-streptograminele B), 4 (7,5%) – rezistență MLS_B constitutivă, iar 12 (22,6%) tulpini – rezistență la macrolide-streptograminele B (MS_B). Rezistența inductibilă MLS_B a fost mai mare în rândul MRSA, în comparație cu MSSA ($p < 0,05$). Rezultatele respective sunt prezentate în tabelul 2.

Tabelul 2

Rezistența inductibilă la clindamicină a tulpinilor de S. aureus izolate din ulcere trofice

Fenotipurile	ERY	CLI	Testul D	MRSA (n=23)	MSSA (n=30)	S. aureus total (n=53)
MLS_B inductibile	R	S	+	10 (43,5%)	2 (6,7%)	12 (22,6%)
MLS_B constitutive	R	R	-	2 (8,7%)	2 (6,7%)	4 (7,5%)
MS_B	R	S	-	5 (21,7%)	7 (23,3%)	12 (22,6%)
Sensibile	S	S	-	6 (26,1%)	19 (63,3%)	25 (47,2%)

Notă. MLS_B – macrolide-lincosamide-streptogramine B; MS_B – macrolide-streptogramine B; ERY – eritromicină; CLI – clindamicină.

Dintre cele 53 de tulpini *S. aureus* izolate din ulcere trofice, 39 (73,6%) au produs biofilm detectabil ($OD_{630} > 0,120$). În ceea ce privește statutul biofilmului, 19 (48,7%) izolate au produs biofilm puternic ($OD > 0,222$), iar 20 (51,3%) izolate au produs biofilm moderat ($0,112 < DO \leq 0,222$). Dintre acestea, 21 (53,8%) au fost MRSA și 28 (71,8%) au fost multi-drogrezistente (MDR). Dintre cele 14 (26,4%) tulpini de *S. aureus* care nu au produs biofilme, 2 (14,3%) tulpini au fost MRSA și 8 (57,1%) – MDR.

Discuții

Testarea sensibilității tulpinilor de *S. aureus*, izolate din ulcere trofice, la antibiotice a evidențiat niveluri ridicate de rezistență la agenții antimicrobieni, cu prezența unor fenotipuri de importanță clinică și epidemiologică, dintre care se remarcă incidența crescută a tulpinilor metilicilino-rezistente (43,4%) și a fenotipurilor MDR (67,7%). *Staphylococcus aureus* rezistent la metilicilină este cea mai importantă cauză a infecțiilor asociate asistenței medicale în întreaga lume. În anul 2009, în Europa, doar șase țări au raportat tendințe de scădere pentru MRSA [1]. În 2016, deși problema pare să se fi stabilizat sau chiar, în unele țări europene, incidența infecțiilor determinate de această tulpină bacteriană să fi scăzut, MRSA rămâne o problemă de sănătate publică, deoarece proporția acestora este încă mai mare de 20% [3]. Cele mai recente date ale EARS (Auris Medical Holding Ltd. Common Shares, 2016) indică România (39,0%) și Croația (35,1%) cu un procent al MRSA de peste 35% – singurele țări din Europa cu așa nivel de rezistență. Rate similare de *S. aureus* metilicilino-rezistent au fost raportate și în alte studii, efectuate în Republica Moldova (40,4%) [7].

În ceea ce privește rezistența la rifampicină, comparativ cu rapoartele EARS, constatăm că nivelul de rezistență este foarte înalt: 82,6% pentru tulpinile MRSA și 56,7% pentru tulpinile MSSA.

Conform aceluiași raport al EARS cu privire la rezistența antimicrobiană în Europa pentru anul 2016, tulpinile de MRSA au asociat rezistență la fluorochinolone (10,7%), comparativ cu tulpinile de MRSS, pentru care frecvența a fost de doar 6% [3]. În cazul studiului nostru, tulpinile izolate de MRSA au asociat o rezistență la fluorochinolone de 73,9% (mult superioară celei raportate de EARS).

Clindamicina este unul dintre preparatele ce se utilizează pentru tratamentul infecțiilor cauzate de MRSA [6]. Însă, din cauza ratei crescute de rezistență inductibilă la clindamicină printre tulpinile de *S. aureus*, în principal MRSA, există șanse mari de eșec terapeutic la utilizarea acestui remediu pentru tratamentul infecțiilor cauzate de tulpinile cu acest tip de rezistență [16]. Așadar, un simplu test, cum este testul D, pentru detectarea rezistenței inductibile la clindamicină este crucial pentru a ghida tratamentul infecțiilor cauzate de *S. aureus*.

Rate mai mari de rezistență la metilicilină și polirezistență au fost înregistrate la tulpinile de *S. aureus* producătoare de biofilme, în comparație cu tulpinile care nu au format biofilme. Aceasta se datorează naturii protectoare a biofilmului, bacteriile care cresc în el sunt intrinsec rezistente la multe antibiotice. Rezistența la antibiotice a tulpinilor bac-

teriene care se află în biofilme poate crește până la 1000 de ori. Principalele motive pot fi pătrunderea dificilă a antibioticelor prin biofilm, viteza lentă de creștere a bacteriilor și prezența mecanismelor de degradare a antibioticelor [8]. Mai mult, biofilmul formează o platformă pentru transferul orizontal de gene între bacterii, astfel determinând răspândirea markerilor de rezistență la antibiotice și a altor factori de virulență [15].

Concluzii

În rândul tulpinilor de *Staphylococcus aureus* izolate din ulcere trofice au fost înregistrate rate înalte de rezistență la antibiotice. Rata de izolare a tulpinilor MRSA s-a dovedit a fi înaltă. Rezistența inductibilă la clindamicină constituie o gravă problemă pentru managementul infecțiilor cauzate de *S. aureus*. Deci, D testul pentru detectarea rezistenței inductibile la clindamicină trebuie să fie inclus în diagnosticul de laborator de rutină. Mai mult, având în vedere nivelul ridicat de tulpini de *S. aureus* producătoare de biofilm, detectarea formării biofilmului de asemenea ar trebui să fie inclusă în testele de rutină.

În baza rezultatelor de testare a sensibilității la antibiotice, tetraciclină și cloramfenicolul pot fi utilizate pentru tratamentul empiric al infecțiilor cauzate de *S. aureus*. Cu toate acestea, linezolidul și vancomicina rămân a fi indicate pentru tratamentul empiric al infecțiilor severe, cauzate de *S. aureus*.

Bibliografie

1. *Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2009*. Disponibil pe: <https://www.ecdc.europa.eu/>
2. D test Clinical and Laboratory Standards Institute. CLSI Document M100-S25. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty fifth informational supplement edition*. Wayne: CLSI; 2015. Disponibil pe: <http://file.qums.ac.ir/repository/mmrc/CLSI2015.pdf>
3. *EARSS Annual Report 2016*. Disponibil pe: <https://www.ecdc.europa.eu/>
4. *EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance*. Version 2.01. 2017. Disponibil pe: <https://pdfs.semanticscholar.org/8fa9/0d4e48d77c9fb0e33a4e700d45cdd09b232.pdf>
5. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. *Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters*. Version 9.0. 2019. Disponibil pe: http://www.nicd.ac.za/wpcontent/uploads/2019/10/v_9.0_EUCAST_QC_tables_routine_and_extended_QC.pdf
6. Ansari S., Nepal H., Gautam R., et al. Threat of drug resistant *Staphylococcus aureus* to health in Nepal. In: *BMC Infect. Dis.* 2014, nr. 14, p. 157.
7. Balan G., Covantev S., Cazacu-Stratu A. et al. Frequency of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in healthcare associated infections in the Republic of Moldova. In: *Romanian Archives of Microbiology and Immunology*, 2017, pp. 79-84.

8. Butt A., Khan A. Antibiotics resistance of bacterial biofilms. In: *Middle East Journal of Business*, 2015, vol. 10(4), pp. 38-45. Disponibil pe: doi 10.5742/MEJB.2015.92718
9. Christensen G., Simpson W., Younger J. et al. Adherence of coagulase negative Staphylococci to plastic tissue cultures: a quantitative model for the adherence of Staphylococci to medical devices. In: *J. Clin. Microbiol.* 1995, nr. 22, pp. 996-1006.
10. Holt J., Krieg N., Sneath P., et al. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Baltimore: Williamsons and Wilkins, 1994, pp. 544-551.
11. Ionescu-Călinești L. Tratatamentul multidisciplinar al ulcerului de gambă. In: *Săptămânal al personalului medico-sanitar*. 2015, nr. 9(1311).
12. Jankūnas V., Rimdeika R., Pilipaitytė L. Treatment of the leg ulcers by skin grafting. In: *Medicina*. Kaunas, 2004, vol. 40(5), pp. 429-433.
13. Magiorakos A., Srinivasan A., Carey R., et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. In: *Clin. Microbiol. Infect.* 2012, nr. 18, pp. 268-281.
14. Margolis D. Venous leg ulcer: incidence and prevalence in the elderly. In: *The American Journal of Medicine*. 2002, vol. 46(3), pp. 381-386.
15. Neupane S., Pant N., Khatiwada S., et al. Correlation between biofilm formation and resistance toward different commonly used antibiotics along with extended spectrum beta lactamase production in Uropathogenic *Escherichia coli* isolated from the patients suspected of urinary tract infections visiting Shree Birendra Hospital, Chhauni, Kathmandu Nepal. In: *Antimicrob. Resist. Infect. Control*. 2016, nr. 5, p. 5.
16. Prabhu K., Rao S., Rao V. Inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from clinical samples. In: *J. Lab. Physicians*. 2011, vol. 3(1), pp. 25-27.
17. Sasanka C. Venous ulcers of the lower limb: where do we stand? In: *Indian Journal of Plastic Surgery*. 2012, vol. 45(2), pp. 266-274.
18. Skrlin J. Impact of biofilm on healing and a method for identifying it in the wound. In: *Acta Med. Croatica*. 2016, vol. 70(1), pp. 29-32.
19. Szewczyk M., Mościcka P., Jawień A. Quality of life in patients with leg ulcers or skin lesions – a pilot study. In: *Advances in Dermatology and Allergology*. 2015, pp. 465-469. Disponibil pe: doi: 10.5114/pdia.2014.40983
20. Потехина Л.П., Карташова О.Л., Уткина Т.М., Вальшева И.В. Таксономическая структура микрофлоры, колонизирующей венозные трофические язвы, и ее персистентные свойства. В: *Бюллетень Оренбургского Научного Центра УрО РАН*. 2012, № 3. <https://cyberleninka.ru/article/>
21. Мустафаев М.Ш., Кудаев Ш.С., Хараева З.Ф. Факторы персистенции микроорганизмов, выделенных при гнойно-воспалительных осложнениях переломов челюстных костей. В: *Фундаментальные исследования*. 2005, № 5, с. 78-79.
22. Лабинская А., Волина Е. *Руководство по медицинской микробиологии*. Москва, 2010, с. 50-71.

Greta Bălan, dr. șt. med., conferențiar universitar,
IP USMF Nicolae Testemițanu,
tel.: 069156019, e-mail: greta.balan@usmf.md