

---

TEZĂ DE DOCTORAT

# Terapia multimodală mediată nanotehnologic a plăgilor chirurgicale infectate cu germeni multirezistenți

---

Doctorand **Michaela Corina Crișan**

---

Conducător de doctorat **Șef lucr. Lucian Mocan**

---



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

## CUPRINS

INTRODUCERE	2
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	2
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	3
DISCUȚII GENERALE	8
CONCLUZII GENERALE	8
ORIGINALITATEA ȘI CONTRIBUȚIILE INOVATIVE ALE TEZEI	9

Cuvinte cheie: nanoparticule de argint, infecții nosocomiale, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, tratament antibiotic

### INTRODUCERE

Infecțiile nosocomiale reprezintă una din cele mai importante probleme de sănătate publică din întreaga lume, care cauzează anual un număr uriaș de morbidități și decese și împovărează bugetele destinate sănătății fiecărui stat. Cele mai frecvente infecții nosocomiale sunt reprezentate de infecțiile sanguine, infecțiile aparatului respirator, infecțiile chirurgicale și ale plăgilor și infecțiile urinare. Infecțiile plăgilor reprezintă peste 25% din totalul acestor infecții și necesită pe lângă tratamentul antibiotic și alte proceduri chirurgicale ca incizii și drenaje, care prelungesc și mai mult procesul de vindecare. Deși tratamentul infecțiilor bacteriene necesită administrarea de antibiotice după protocoale bine stabilite pe plan mondial, administrarea în exces și nejustificată de cele mai multe ori a antibioticelor a dus la apariția rezistenței antimicrobiene și a bacteriilor multirezistente. *Stafilococul Aureus Meticilinorezistent* MRSA și *Escherichia coli* sunt cele mai elocvente bacterii în acest caz, se întâlnesc atât în spital cât și comunitar, la oameni dar și la animale, fiind considerată cea mai îngrijorătoare amenințare la adresa sănătății populației din întreaga lume.

### STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Nanoparticulele metalice, în special cele de argint, datorită proprietăților lor unice și speciale pot deveni o alternativă la tratamentul antibiotic, antitumoral, antigungic, antiviral sau antiinflamator. Nanoparticulele de argint se pot obține prin mai multe metode: fizice, chimice și biologice, fiecare cu avantajele și dezavantajele sale. Caracteristicile cele mai importante ale nanoparticulelor sunt influențate de metoda de producere și sunt date de formă, mărime, încărcătura electrică și concentrația acestora. Mărimea nanoparticulelor de argint determină proprietățile fizice, chimice și biologice, este influențată de metoda de producere și de condițiile de mediu. Cele mai multe studii din literatura de specialitate au arătat că nanoparticulele de dimensiuni mici au activitatea cea mai intensă. Aceste activități pot fi mult îmbunătățite prin combinarea cu alte substanțe care le cresc biocompatibilitatea și stabilitatea. Forma

nanoparticulelor afectează proprietățile optice și depinde de temperatura de reacție, tipul și concentrația reactivilor folosiți și prezența altor substanțe chimice din procesul de reacție. Nanoparticulele pot avea forme sferice, cubice, plate, triunghilare, tije, proprietate care le influențează activitatea, studiile arătând că cele sferice sunt cele mai eficiente ca agenți antibacterieni și antitumorali. Încărcătura electrică este un alt factor care influențează activitatea nanoparticulelor, studiile arătând că încărcătura pozitivă a nanoparticulelor de argint a demonstrat o activitate antibacteriană și toxicitate crescută pentru că membrana celulei bacteriene fiind încărcată negativ ca încărcătură electrică, atrage ionii pozitivi care pătrund mai ușor în celula bacteriană. Deși mecanismul de acțiune nu este pe deplin elucidat, este strâns legat de proprietățile fizice, chimice, optice și electrice ale nanoparticulelor și se bazează pe interacțiunile ionilor de argint cu membrana celulei bacteriene care duce la distrugerea integrității membranei, produce stres oxidativ și specii reactive de oxigen, se perturbă metabolismul celular și sinteza de ATP, iar sinteza ADN-ului este modificată având ca urmare moartea celulei.

Studiile din literatura de specialitate au arătat că nanoparticulele de argint prezintă activitate antibacteriană, antitumorală, antivirală, antifungică, antiinsecticidă, antihelmințică și antidiabetică, fiind utilizate pe scară largă în cele mai diverse domenii de activitate ca medicină și farmacie, industrie și agricultură, protecția mediului, etc...

## CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

Teza de față are 3 obiective majore:

1. Să stabilească rolul infecției cu *Staphylococcus aureus* și *Escherichia coli* asupra evoluției pacienților internați în secțiile chirurgicale cu patologie digestivă și cu alte comorbidități
2. Să identifice factorii de risc în apariția acestor infecții provocate de *Staphylococcus aureus* și *Escherichia coli* și modul în care influențează starea și evoluția pacientului de la internare până la externare
3. Să identifice alte metode de tratament, pe lângă antibioterapia folosită în prezent pentru tratamentul pacienților infectați cu aceste superbacterii.

Obiectivele propuse s-au realizat prin 3 studii. Primele două studii au fost de tip retrospectiv și au analizat influența infecției cu *Staphylococcus aureus* și *Escherichia coli* asupra unui lot de pacienți internați în perioada 1 ianuarie 2018 - 31 decembrie 2019 în secțiile chirurgicale și terapie intensivă ale Institutului Regional de Gastroenterologie și Hepatologie O. Fodor din Cluj Napoca și au urmărit evoluția acestor pacienți până la externare, analizând prin metode statistice corespunzătoare, corelațiile dintre rezultatele probelor biologice, tipul infecției asociată cu comorbiditățile pacienților luați în studiu, tratamentul aplicat și legătura dintre infecție și starea la externare a acestor pacienți. Aceste studii au stat la baza publicării articolelor în revistele de specialitate. Al treilea studiu este un studiu experimental, care poate constitui o bază de pornire pentru investigații suplimentare care urmăresc posibilitatea de a aplica diferite tratamente ca nanoparticule metalice biofuncționalizate cu antibiotice, pentru cazurile unde s-au pus în evidență bacterii multirezistente.

În primul studiu retrospectiv, s-a urmărit evoluția a 34 pacienți la care s-a pus în evidență bacteria din genul *Staphylococcus*. În urma prelucrării statistice a datelor colectate, am obținut următoarele date: Pacienții luați în studiu, 23 de bărbați și 11 femei, 18 au provenit din mediul urban și 16 din mediul rural, au avut vârste cuprinse între 26 și 85 de ani iar numărul de zile de spitalizare a fost cuprins între 2 și 91 de zile. La acești pacienți s-au consemnat mai multe tipuri de comorbidități (cardiace, digestive, pulmonare, renale neurologice și diabet zaharat) care au influențat valorile probelor biologice recoltate la internare și s-au obținut mai multe date semnificativ statistic ( $p \leq 0,05$ ) în cazul hematiilor, hematocritului hemoglobinei, proteinei C reactive, ureei, creatininei și în cazul pacienților diabetici și a glicemiei. În cazul pacienților luați în studiu, valorile ureei și creatininei serice au fost crescute încă de la internare în cazul pacienților cu boli renale consemnate și au avut valori normale în cazul pacienților fără afectare renală considerându-se valori normale ale ureei 18-48 mg/dl și pentru creatinină 0.67-1.17mg/dl. Pe perioada internării, pentru punerea în evidență a bacteriilor s-au recoltat mai multe tipuri de probe, cele mai multe au fost hemoculturi, apoi însămânțări ale cateterului venos central, uroculturi, secreții treheale, din plagă, peritoneale și de la nivelul tubului de dren, coproculturi și biliculturi. Din totalul probelor pozitive, 14 probe au detectat prezența *Staphylococcus aureus* *meticiclinorezistent*. În cazul secrețiilor traheale, dintr-un număr de 12 probe pozitive, în 6 cazuri a fost detectată prezența MRSA, urmată de hemoculturi și însămânțarea cateterului venos central cu câte 3 probe pozitive pentru această bacterie multirezistentă. Tratamentul antibiotic a fost realizat cu mai multe clase de antibiotice, administrarea a ținut cont de boala de bază, comorbiditățile asociate, starea pacientului, rezultatele probelor biologice și bacteriologice recoltate pe parcursul internării, vârstă și alergiile medicamentoase consemnate la pacienții luați în studiu. Cei mai mulți pacienți au primit Nitroimidazol, Cefalosporine de generația a III-a, Carbapenemi, Glicopeptide și Polipeptide, iar câte un pacient a primit Cefalosporine de generația a IIa, Lincosamide, Nitrofurani și Tetraciline în una sau mai multe combinații.

Cele mai multe decese înregistrate au fost în cazul combinațiilor 10 (Cefalosporinele de generația a III a cu Carbapenemi și Nitroimidazol), 4 (Carbapenemi cu Glicopeptide) și 5 (Carbapenemi cu Polipeptide), dovedind că combinațiile administrate nu au fost eficiente. În lotul studiat au fost înregistrați 13 pacienți cu boală renală confirmată la internare iar 9 dintre aceștia au decedat și 4 pacienți au fost declarați ameliorați. În acest lot nu am avut nici un pacient declarat vindecat la externare ci numai ameliorați și decedați. Acești pacienți au primit una sau mai multe combinații de antibiotice pe perioada internării dar aceste combinații nu au avut efectul scontat. 5 dintre ei au primit și combinații de 7 antibiotice, 3 pacienți au primit câte 6 combinații și doar un pacient a primit o singură clasă de antibiotice. Decesul în lotul studiat a fost de 44.11% (15 pacienți), sexul masculin fiind cel mai afectat. Doar 5 pacienți din lotul studiat au fost declarați vindecați la externare (14.7%) și ameliorați 14 (41.17%). Peste 50% dintre decese au avut ca și cauză o boală neoplazică alături de infecția stafilococică detectată pe parcursul internării. În cazul pacienților din lotul studiat, valorile medii ale ureei au fost mult crescute în cazul pacienților cu boli renale și a celor decedați ( $118.08 \pm 60.22$ ) și au fost consemnate valori normale în cazul pacienților fără afectare renală.

Factorii de risc au fost reprezentați de vârsta și comorbiditățile pacienților, internarea prelungită mai ales pe secțiile de terapie intensivă, tratamentul prelungit cu antibiotice și

manoperele medicale invazive care pot fi sursă de infecții nosocomiale . Datele obținute au arătat că bolile renale și diabetul zaharat au fost factori de risc importanți și relevanți. Internarea prelungită (peste 30 de zile ) a fost întâlnită în multe din cazurile luate în studiu, media spitalizării fiind cuprinsă la bărbați între 29.913+/-22.055 zile și la femei 33.091+/-27.671, numărul maxim de zile de spitalizare în cazul unui pacient luat în studiu fiind de 91 de zile. Anemia a fost unul dintre factorii de risc majori care a influențat multe din corelațiile înregistrate, fiind relevantă statistic în multe cazuri. La fel ca *Staphylococcus aureus*, MRSA poate da o multitudine de infecții cu localizări diferite.Și în acest studiu mortalitatea pacienților cu boli severe la care au fost detectate infecții stafilococice a fost ridicată, peste 40%, durata spitalizării prelungită și costurile de tratament ridicate.

Al doilea studiu retrospectiv, a înregistrat 201 de pacient internați la care s-a pus în evidență bacteria *E coli*. În urma prelucrării statistice a datelor colectate din foile de observație a pacienților internați în perioada menționată, am obținut următoarele date: au fost incluși în studiu un total de 201 pacienți dintre care 114 bărbați și 87 de femei cu o medie de vârstă de 63.3584 ani +/-13.8821(DS), 117 provenind din mediu urban și 84 de pacienți din mediu rural, cu un număr mediu de zile de spitalizare de 20.866 zile +/-20.7831(DS).Din totalul pacienților luați în studiu, 199 dintre aceștia au avut patologii digestive (99.0049 %), 163 de pacienți au avut una sau mai multe boli cardiace (81.09%), 41 de pacienți au avut boli neurologice (20.39%), 113 pacienți au avut diabet zaharat de tip I sau II (56.21%), 67 de pacienți au avut boli renale (33.33%) și 43 de pacienți au avut boli pulmonare (21.39%). Din cei 201 pacienți luați în studiu 67 dintre aceștia, adică 33.3% au avut afectare renală confirmată încă de la internare, valoarea medie a uremiei a fost de 65.76 mg/dl +/-52.41(DS). Valoarea medie a uremiei la internare, în grupul studiat, la pacienții fără boală renală (FBR), prezentând *E coli* patogen, a fost de 37.25mg/dl +/-17.39(DS) pentru 66.6 % pacienți. Corelația statistică între rezultatele probelor biologice (ureea sanguină și creatinina) consemnate la internare cu boala renală în comorbiditate, la pacienții luați în studiu este semnificativă statistic.La pacienții luați în studiu s-au detectat încă 40 de tipuri de bacterii pe lângă bacteria *Escherichia coli* și alte tipuri de fungi.

Datorită prezenței bacteriilor și fungilor, tratamentul antibiotic a fost inițiat cu antibiotice cu spectru larg de acțiune și apoi conform antibiogramei, specific fiecărui tip de bacterie. Cea mai frecventă clasă de antibiotice folosită a fost Nitroimidazolul, care a fost urmat de Cefalosporinele de generația a IIIa, Carbapenemi și Glicopeptide.

Necesarul de combinații de antibiotice din ce în ce mai complex a fost necesar în cazul pacienților cu comorbiditate renală unde s-a dovedit că a existat o rezistență crescută a bacteriilor la tratamentul administrat.În cazul pacienților cu boală digestivă dar fără afectare renală numărul de combinații de antibiotice folosit a fost mai mic comparativ numărul de combinații de antibiotice folosite în cazul pacienților cu boală digestivă și afectare renală. În cazul pacienților cu afectare renală care au primit combinațiile de antibiotice din grupa 3, Cefalosporine de generația a III-a, Carbapenemi și Glicopeptide,numărul de zile de spitalizare a fost crescut, la fel ca numărul de decese.Cele mai mari valori ale numărului de zile de spitalizare,s-au înregistrat în cazul grupei de antibiotice 11 unde am avut combinații de Nitroimidazol cu Cefalosporine de generația a III-a,Carbapenemi și Glicopeptide și s-au înregistrat cele mai multe decese atât în cazul pacienților cu boală renală asociată cât și în cazul celor fără boală renală asociată.

În cazul pacienților decedați cel mai frecvent utilizat antibiotic a fost cel din clasa Carbapenemilor în 31 de cazuri, Nitroimidazolul în 29 de cazuri, în 25 de cazuri Cefalosporine de generația a III a și în 24 de cazuri s-au administrat Glicopeptide în una sau mai multe combinații. Doar doi pacienți din acest grup au primit Fluorochinolone, Peniciline și Lincosamide și un singur pacient a primit Fluorochinolone într-o singură combinație pentru infecția urinară.

Spitalizarea prelungită mai ales în secțiile de terapie intensivă, comorbiditățile asociate și infecțiile recurente, vârsta pacientului, tratamentul repetat și îndelungat cu antibiotice și antisecretoare dar și manoperele medicale invazive cu risc de infecții nosocomiale sunt câțiva dintre factorii de risc incriminați în apariția infecțiilor cu *Escherichia coli*.

În studiul 3 activitatea antibacteriană a nanoparticulelor de argint a fost testată împotriva mai multor bacterii : *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* cod GR 0333, *Enterococcus faecalis* ATCC29212, *Escherichia coli* ATCC 25922,, *Klebsiella pneumoniae* cod GR 8575 (colonii rugoase), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Rezultatele au indicat că nanoparticulele de argint prezintă activitate antibacteriană dovedită prin apariția zonei de inhibiție, diferită ca mărime, în cazul bacteriilor studiate.

În cazul *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 prin testarea la clasa de antibiotice de betalactamine, macrolide, lincosamide și nanoparticule de argint, am obținut următoarele rezultate: antibioticele testate au dovedit efect antibacterian fapt dovedit de mărimea zonei de inhibiție de peste 10 mm în cazul penicilinei și peste 25 mm în cazul celorlalte clase de antibiotice testate, iar soluția de nanoparticule de argint mai concentrată, de 100 μg/mL a avut un efect antibacterian superior celei de 10 μg/mL. Combinațiile de antibiotice cu nanoparticule de argint cu concentrația 100 μg/mL au avut efect bactericid superior antibioticelor sau soluției de nanoparticule luate separate. Efectul antibacterian al nanoparticulelor de argint depinde și de cantitatea acestora aplicată pe placa de mediu de cultură, zona de inhibiție este mai mare în cazul aplicării a 100 μL comparativ cu aplicarea unei cantități mult mai mici de soluție (20 μL). În cazul testării aceleași bacterii la aminoglicozide, antibioticele testate au dovedit efect antibacterian, zona de inhibiție în cazul fiecărui antibiotic a fost peste 20mm, dar combinația dintre acestea și soluția de nanoparticule de argint cu concentrația de 10 μg/mL s-a dovedit la fel de eficientă, deși efectul antibacterian a nanoparticulelor de argint 10 μg/mL a fost mai scăzut, sub 10 mm zona de inhibiție. Folosind aceleași antibiotice pentru testare, zonele de inhibiție pentru antibiotic au fost la fel ca și în cazul primei plăci dar soluția de nanoparticule de argint mai concentrată a dezvoltat o zonă de inhibiție mai mare, de 12 mm comparativ cu soluția mai diluată, care a avut doar 9 mm. În cazul testării la clasa de antibiotice a fluorochinolonei, zona de inhibiție a fost în toate cele 3 cazuri mai mare de 20mm și peste 10 mm în cazul nanoparticulelor de argint, dovedind efectul inhibitor al antibioticului dar și al nanoparticulelor de argint. Și în acest caz mărimea zonei de inhibiție a fost mai mare în cazul combinațiilor dintre nanoparticulele de argint și antibioticele testate, dar în acest caz nu am obținut un efect sinergic între soluțiile de nanoparticule de argint și discurile de antibiotic iar zona de inhibiție a fost mai mare pentru soluția de nanoparticule de argint de 100 μg/mL adică 13mm comparativ cu soluția de 10 μg/mL care a avut doar 9mm. În cazul testării la tetraciline, sulfamide, oxazolidinone și nanoparticule de argint de 10 și 100 μg/mL am obținut valori ale zonei de inhibiție peste 24mm în cazul celor 3 antibiotice și 13 mm în cazul soluției de

nanoparticule de argint de 100 µg/mL. Nu am obținut efect sinergic între antibioticele folosite și soluțiile de nanoparticule de argint din ambele concentrații.

În cazul *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) zona de inhibiție a fost mult mai mică la testarea cu Penicilină 1 µg (6mm) și doar 12 mm în cazul testării la Cefotaxim 30 µg comparativ cu *S aureus*. Combinând antibioticele testate cu soluția de nanoparticule de argint cu concentrația de 10 µg/mL efectul inhibitor este la fel cu al antibioticului, dovedind că concentrația scăzută de nanoparticule de argint prezintă efect inhibitor scăzut. În cazul testării la clasa de antibiotice macrolide, lincosamide și nanoparticule de argint 10 µg/mL zonele de inhibiție obținute au fost mici în cazul Eritromicinei și combinației acesteia cu nanoparticulele de argint (12 mm) și respectiv 31 și 32 mm în cazul Clindamicinei și combinației acesteia cu nanoparticulele de argint. În cazul testării la aminoglicozide, nanoparticule de argint și combinațiile acestora am obținut zone de inhibiție crescute la toate antibioticele din această clasă, de aproximativ 30mm dar prin combinarea cu nanoparticule de argint cu concentrație mică efectul inhibitor nu a fost mai mare. În cazul testării la fluorochinolone, nanoparticule de argint și combinațiile acestora am obținut zone de inhibiție crescute pentru toate antibioticele din această clasă testate dar la combinarea cu soluția de nanoparticule de argint de concentrație mică zona de inhibiție nu a fost relevant crescută, dovedind ca și în cazul aminoglicozidelor că nu este eficientă. În cazul testării la peniciline, glicopeptide, cefalosporine de generația a II-a și nanoparticule de argint 100 µg/mL s-au obținut zone de inhibiție peste 15 mm în cazul glicopeptidelor, de 12 mm în cazul cefalosporinelor de generația a II-a și 16 mm în cazul nanoparticulelor de argint mai concentrate, comparativ cu 6 mm în cazul soluției de nanoparticule de argint cu concentrația de 10 µg/mL, dovedind că creșterea concentrația soluției duce la creșterea direct proporțională a zonei de inhibiție. Penicilina a dezvoltat cea mai mică zonă de inhibiție (6 mm) pe această placa de cultură.

La testarea bacteriei *Escherichia coli* la clasa de antibiotice a fluorochinolonei am obținut zone de inhibiție peste 25 mm la toate cele 3 antibiotice testate și o zonă de inhibiție de 14 mm în cazul nanoparticulelor de argint 100 µg/mL, dovedind eficiența antibioticelor testate dar și a soluției mai concentrate de nanoparticule de argint și se observă sinergism între nanoparticulele de argint și ciprofloxacina. La testarea cu aminoglicozide și nanoparticule de argint am obținut valori de peste 18 mm în cazul antibioticelor și 13mm în cazul nanoparticulelor de argint. Aceași valoare de 13 mm a zonei de inhibiție am obținut-o în cazul testării *E coli* la nanoparticulele de argint 100 µg/mL cu betalactamine, cu unde valorile zonei de inhibiție au fost de 17mm pentru Ampicilina 10 µg și pentru Amoxicilina 30 µg zona de inhibiție a fost de 20mm.

Managementul infecțiilor produse de bacteriile multirezistente reprezintă o provocare uriașă din cauza limitării livrării sistemice convenționale de antibiotice datorită ischemiei locale, irigației deficitare și prezenței necrozei tisulare. În cazul plăgilor infectate cu germeni multirezistenți penetrarea antibioticelor în aceste zone este limitată din cauza vascularizației deficitare și grosimii peretelui capsular, care face de multe ori ca penetrarea să fie absolut imposibilă chiar dacă se folosesc concentrații plasmatiche ridicate de antibiotice. Administrarea antibioticelor în doze crescute crește mult toxicitatea acestora mai ales la nivel hepatic, renal și cerebral iar aceste efecte toxice pot agrava comorbiditățile existente și pot duce la agravarea stării pacientului sau chiar la deces.

Nanoparticulele de argint demonstrează activitate antibacteriană mai bună împotriva *E coli* comparativ cu *S aureus*, și administrarea lor poate deveni o alternativă la antimicrobienele sintetice în lupta împotriva bacteriilor multirezistente.. Analizând activitatea antibacteriană a nanoparticulelor de argint de diferite concentrații și a diferitelor antibiotice pentru *S aureus* și *E coli* zona de inhibiție a fost diferită, demonstrând că bacteriile din grupe (gram pozitive și gram negative) diferite reacționează diferit la antibiotice diferite.

## **DISCUȚII GENERALE**

Conceptul acestei teze a pornit de la faptul ca terapia standard în infecțiile bacteriene ale plăgilor produse de germeni multirezistenți ca MRSA și *Escherichia coli* se tratează cu antibiotice din clase diferite conform antibiogramelor și comorbidițiilor asociate a pacientului infectat. În același timp, studiind literatura de specialitate, am observat că un număr tot mai mare de germeni tind să dezvolte rezistență la multe din antibioticele existente folosite în mod curent. Existența protocoalelor standardizate de tratament în cazul bacteriilor multirezistente este bine definită și tinde să se aplice corect în multe din unitățile sanitare din întreaga lume. Deoarece infecțiile nosocomiale generează costuri uriașe în sistemele de sănătate atât în țările dezvoltate dar mai ales în țările mai sărace, morbiditatea și mortalitatea în aceste cazuri este deosebit de crescută.

Pornind de la acest lucru am elaborat 2 studii în care am urmărit pe un lot mare de pacienți efectele infecțiilor bacteriene -stafilococice și cu *E coli*, precum și tratamentul antibiotic administrat acestor pacienți iar în al 3-lea studiu am efectuat cercetări experimentale, in vitro, în utilizarea nanoparticulelor de argint care ar putea fi folosite în viitor ca metodă de tratament sigură și viabilă în tratarea infecțiilor provocate de germenii multirezistenți care generează anual costuri uriașe dar și decese în rândul acestor pacienți. Rezultatele acestui studiu pot sta la baza cercetărilor viitoare iar prin rezolvarea problemelor de stabilitate, compatibilitate și toxicitate redusă asupra organismelor vii se pot obține noi medicamente care să rezolve multirezistența bacteriană.

## **CONCLUZII GENERALE**

Primul studiu a acestei teze a urmărit evoluția a 34 de la care s-a pus în evidență bacteria din genul *Staphylococcus* și am analizat prin metode statistice adecvate evoluția acestora pe perioada internării. Scopul acestui studiu a fost de a valida ipoteza conform căreia infecțiile bacteriene, respectiv infecția stafilococică crește incidența complicațiilor, crește durata spitalizării și costurile acesteia și crește morbiditatea și mortalitatea acestor pacienți. Studiul a demonstrat că administrarea în exces și nejustificată de cele mai multe ori a antibioticelor a dus la apariția rezistenței antimicrobiene și a bacteriilor multirezistente.. Glicopeptidele rămân antibioticele de primă intenție în cazul acestor infecții dar și alte clase de antibiotice și-au dovedit eficiența în tratamentul acestor infecții . Și în acest studiu mortalitatea pacienților cu boli severe la care au fost detectate infecții stafilococice a fost ridicată, peste 40%, durata spitalizării prelungită și costurile de tratament ridicate.

În al 2-lea studiu a urmărit evoluția a 201 de pacienți la care s-a pus în evidență bacteria *Escherichia coli*. Această bacterie are un genom extrem de variat, se întâlnește cel mai frecvent în

infecțiile digestive și cele de tract urinar și are un impact epidemiologic important asupra sănătății populației din întreaga lume. Tratatamentul acestei infecții necesită administrarea uneia sau a mai multor clase de antibiotice ceea ce prelungește durata spitalizării și crește costurile de tratament.. În cazul pacienților din lotul studiat, mortalitatea a fost de 17.5%, sexul masculin fiind mai afectat compartiv cu sexul feminin și a fost dată de complicațiile comorbidităților consemnate la acești pacienți la care s-au pus în evidență infecțiile produse de *Escherichia coli* alături de alte bacterii și fungi. Tratatamentul antibiotic administrat la pacienții din lotul studiat a cuprins una sau mai multe clase de antibiotice, cel mai fecvent utilizat antibiotic a fost Metronidazolul din clasa Nitroimidazolului, urmat de Cefalosporinele de generația a IIIa, Carbapenemi și Glicopeptide în diferite combinații, conform antibiogramelor și comorbidităților pacienților pe toată perioada de spitalizare.

Al 3 lea studiu reprezintă o cercetare experimentală care încearcă să dovedească efectul antibacterian al nanoparticulelor de argint asupra unor culturi de celule bacteriene de *Staphylococcus aureus*, MRSA și *Escherichia coli*. Combinarea nanoparticulelor de argint cu antibiotice arată că efectul bactericid crește semnificativ, fapt dovedit prin mărimea zonei de inhibiție determinată în cazul celor două bacterii studiate. Acest fapt confirmă aplicabilitatea acestor nanomateriale în industria farmacologică care este supusă unor reale provocări datorate apariției rezistenței microbiene la multe din bacteriile și fungii care afectează organismele umane și animale. După cum arată și studiile și cercetările recente din literatura de specialitate sunt încă necesare studii in vivo pentru a putea dezvolta biocompatibilitatea și a reduce toxicitatea nanoparticulelor asupra celulelor.

Combinarea nanoparticulelor de argint cu diferite clase de antibiotice pot crește efectul antibacterian și pot produce zone de inhibiție mai mari comparativ cu soluția apoasă din plante sau nanoparticulele de argint necombinate în diferite concentrații.

## **ORIGINALITATEA ȘI CONTRIBUȚIILE INOVATIVE ALE TEZEI**

Teza de doctorat "Terapia multimodală mediată nanotehnologic a plăgilor chirurgicale infectate cu germeni multirezistenți " este originală prin tema aleasă, o temă de un real interes datorită apariției rezistenței microbiene la un număr din ce în ce mai mare de bacterii și fungi care pun în pericol viața pacienților, cresc costurile de spitalizare și cresc morbiditatea și mortalitatea în foarte multe cazuri. Prin studiile realizate, aduce contribuții care evidențiază importanța tratamentului adecvat, conform ghidurilor internaționale de tratament a infecțiilor provocate de bacteriile multirezistente ca MRSA și *E coli*, care ridică serioase probleme de sănătate publică în întreaga lume, atât în țările dezvoltate dar mai ales în țările mai sărace prin costurile uriașe generate de tratament. Bacteriile multirezistente au apărut ca rezultat al folosirii excesive și necontrolate a antibioticelor atât în spital cât și în mediul comunitar, atât la oameni cât și la animale. Cercetările in vitro demonstrează capacitatea nanoparticulelor de a deveni agenți antibacterieni superiori antibioticelor clasice iar combinarea acestora cu molecule de antibiotice le crește semnificativ efectul antibacterian .

Deși nanotehnologia este la început de drum, mai rămân de rezolvat unele probleme de biocompatibilitate și toxicitate care, prin cercetări ulterioare in vivo vor face din aceste nanomateriale medicamentele viitorului.

---

DOCTORAL THESIS

# Nanotechnology-mediated multimodal therapy of surgical wounds infected with multidrug-resistant germs

---

Doctoral Candidate **Michaela Corina Crişan**

---

Coordinator: **Şef lucr. Lucian Mocan**

---



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ŞI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

## CONTENT

INTRODUCTION	2
CURRENT STATE OF KNOWLEDGE	2
PERSONAL CONTRIBUTION	3
GENERAL DISCUSSIONS	8
GENERAL CONCLUSIONS	9
ORIGINALITY AND INNOVATIVE CONTRIBUTIONS OF THE THESIS	10

Keywords:silver nanoparticles, nosocomial infections, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, antibiotic treatment

### INTRODUCTION

Nosocomial infections are one of the most important public health problems worldwide, causing a huge number of morbidities and deaths annually and burdening the health budgets of each state. The most common nosocomial infections are blood infections, respiratory tract infections, surgical and wound infections, and urinary tract infections. Wound infections account for over 25% of all these infections and require, in addition to antibiotic treatment, other surgical procedures such as incisions and drainages, which further prolong the healing process. Although the treatment of bacterial infections requires the administration of antibiotics according to well-established protocols worldwide, the excessive and unjustified administration of antibiotics most of the time has led to the emergence of antimicrobial resistance and multiresistant bacteria. *Staphylococcus aureus methicillinoresistant* MRSA and *Escherichia coli* are the most eloquent bacteria in this case, they are found both in hospital and community, in humans and animals, being considered the most worrying threat to the health of the population worldwide.

### CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

Metallic nanoparticles, especially silver, due to their unique and special properties can become an alternative to antibiotic, antitumor, antiguncic, antiviral or anti-inflammatory treatment. Silver nanoparticles can be obtained by several methods: physical, chemical and biological, each with its advantages and disadvantages.

The most important characteristics of nanoparticles are influenced by the method of production and are given by their shape, size, electric charge and concentration. The size of silver nanoparticles determines the physical, chemical and biological properties, is influenced by the method of production and environmental conditions. Most studies in the literature have shown that small nanoparticles have the most intense activity. These activities can be greatly improved by combining with other substances that increase their biocompatibility and stability. The shape of the nanoparticles affects optical properties and depends on the reaction temperature, the type and

concentration of reagents used, and the presence of other chemicals in the reaction process. Nanoparticles can have spherical, cubic, flat, triangular shapes, properties that influence their activity, studies showing that spherical ones are most effective as antibacterial and antitumor agents. Electric charge is another factor influencing nanoparticle activity, studies showing that the positive charge of silver nanoparticles has demonstrated antibacterial activity and increased toxicity because the bacterial cell membrane being negatively charged attracts positive ions that penetrate more easily into the bacterial cell. Although the mechanism of action is not fully elucidated, it is closely related to the physical, chemical, optical and electrical properties of nanoparticles and is based on the interactions of silver ions with the bacterial cell membrane leading to destruction of membrane integrity, producing oxidative stress and reactive oxygen species, disrupting cellular metabolism and ATP synthesis, and DNA synthesis is altered resulting in cell death.

Studies in the literature have shown that silver nanoparticles exhibit antibacterial, antitumor, antiviral, antifungal, antiinsecticide, anthelmintic and antidiabetic activity, being widely used in the most diverse fields of activity such as medicine and pharmacy, industry and agriculture, environmental protection, etc...

## **PERSONAL CONTRIBUTION**

This thesis has 3 major objectives:

1. To establish the role of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* infection on the evolution of patients admitted to surgical wards with digestive pathology and other comorbidities
2. Identify risk factors in the occurrence of these infections caused by *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* and how they influence the patient's condition and evolution from admission to discharge
3. Identify other treatment methods besides antibiotic therapy currently used to treat patients infected with these superbugs.

The proposed objectives were achieved through 3 studies. The first two studies were retrospective and analyzed the influence of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* infection on a group of patients hospitalized between January 1, 2018 and December 31, 2019 in the surgical and intensive care units of the Regional Institute of Gastroenterology and Hepatology O. Fodor in Cluj Napoca and followed the evolution of these patients until discharge, analyzing by appropriate statistical methods, the correlations between the results of biological samples, the type of infection associated with the comorbidities of the patients taken in the study, the treatment applied and the link between infection and the state at discharge of these patients. These studies were the basis for publishing articles in specialized journals. The third study is an experimental study, which can be a basis for further investigations aimed at applying different treatments as biofunctionalized metal nanoparticles with antibiotics, for cases where multidrug-resistant bacteria have been found.

In the first retrospective study, the evolution of 34 patients was followed, in which the bacterium of the genus *Staphylococcus* was highlighted.. Following the statistical processing of

the collected data, we obtained the following data: The patients taken in the study, 23 men and 11 women, 18 came from urban areas and 16 from rural areas, were aged between 26 and 85 years and the number of days of hospitalization was between 2 and 91 days. In these patients, several types of comorbidities (cardiac, digestive, pulmonary, renal, neurological and diabetes mellitus) were recorded, which influenced the values of biological samples collected at admission and more statistically significant data were obtained ( $p \leq 0.05$ ) in the case of red blood cells, hematocrit, hemoglobin, C-reactive protein, urea, creatinine and in the case of diabetic patients the blood glucose. . In patients in the study, serum urea and creatinine levels were elevated from admission in patients with recorded kidney disease and were normal for patients without renal impairment to be considered normal values for urea 18-48 mg/dl and for creatinine 0.67-1.17mg/dl.

During hospitalization, several types of samples were collected to highlight bacteria, most of them were hemocultures, then central venous catheter seeding, urocultures, tracheal, wound, peritoneal and drainage tube secretions, coprocultures and bilicultures. Of the total positive samples, 14 samples detected the presence of methicycline-resistant *Staphylococcus aureus*. In the case of tracheal secretions, out of a number of 12 positive samples, in 6 cases the presence of MRSA was detected, followed by hemocultures and seeding of the central venous catheter with 3 positive samples for this multiresistant bacterium. The antibiotic treatment was performed with several classes of antibiotics, the administration took into account the underlying disease, associated comorbidities, the patient's condition, the results of biological and bacteriological samples collected during hospitalization, age and drug allergies recorded in the patients in the study. Most patients received Nitroimidazole, Third Generation Cephalosporins, Carbapenems, Glycopeptides and Polypeptides, and one patient each received Second Generation Cephalosporins, Lincosamides, Nitrofurans and Tetracyclines in one or more combinations

Most deaths recorded were in combinations 10 (Third generation cephalosporins with Carbapenemi and Nitroimidazole), 4 (Carbapenems with glycopeptides) and 5 (Carbapenems with Polypeptides), proving that the combinations administered were not effective. In the studied group were registered 13 patients with kidney disease confirmed at admission and 9 of them died and 4 patients were declared improved. In this group we did not have any patients declared cured at discharge, but only improved and deceased.

These patients received one or more combinations of antibiotics during admission, but these combinations did not work. 5 of them also received combinations of 7 antibiotics, 3 patients received 6 combinations each, and only one patient received only one class of antibiotics.

The death in the studied group was 44.11% (15 patients), the male sex being the most affected. Only 5 patients from the studied group were declared cured at discharge (14.7%) and improved 14 (41.17%). Over 50% of deaths were caused by a neoplastic disease along with staphylococcal infection detected during hospitalization. In the case of patients in the study group, mean urea values were significantly increased in patients with kidney disease and deceased ( $118.08 \pm 60.22$ ) and normal values were recorded in patients without renal involvement.

The risk factors were represented by the age and comorbidities of patients, prolonged hospitalization especially in intensive care units, prolonged treatment with antibiotics and invasive

medical maneuvers that can be a source of nosocomial infections. The data obtained showed that kidney disease and diabetes were important and relevant risk factors. Prolonged hospitalization (over 30 days) was encountered in many of the cases taken in the study, the average hospitalization being between 29,913 $\pm$ 22,055 days and in women 33,091 $\pm$ 27,671, the maximum number of days of hospitalization for a patient taken in the study being 91 days. Anaemia was one of the major risk factors that influenced many of the correlations, being statistically relevant in many cases. Like *Staphylococcus aureus*, MRSA can give a multitude of infections with different localizations. And in this study the mortality of patients with severe diseases in whom staphylococcal infections were detected was high, over 40%, the duration of prolonged hospitalization and high treatment costs.

The second retrospective study, approved by the ethics committee of IRGH 5025/12.04.2021 and UMF 116/15.04.2021, registered 201 patients hospitalized between January 1, 2018 and December 31, 2019, in the surgical and intensive care units of IRGH Cluj Napoca where *E coli* bacteria was highlighted. . Following the statistical processing of the data collected from the observation sheets of patients hospitalized during the mentioned period, we obtained the following data: a total of 201 patients were included in the study, of which 114 men and 87 women with an average age of 63,3584 years  $\pm$ 13,8821(DS), 117 coming from urban areas and 84 patients from rural areas, with an average number of hospital days of 20,866 days  $\pm$ 20.7831(SD). Of the total patients taken in the study, 199 of them had digestive pathology (99.0049%), 163 patients had one or more heart diseases (81.09%), 41 patients had neurological diseases (20.39%), 113 patients had type I or II diabetes mellitus (56.21%), 67 patients had kidney disease (33.33%) and 43 patients had lung disease (21.39%). Of the 201 patients taken in the study, 67 of them, i.e. 33.3%, had confirmed renal involvement since admission, the mean value of uremia was 65.76 mg/dl  $\pm$ 52.41(SD).

The mean level of uremia at admission in the study group in patients without renal disease (FBR) with pathogenic *E coli* was 37.25mg/dl  $\pm$ 17.39(SD) for 66.6% patients. The statistical correlation between the results of biological samples (blood urea and creatinine) recorded at admission with kidney disease in comorbidity, in the patients taken in the study is statistically significant,  $p < 0.01$ . In the patients taken in the study, 40 more types of bacteria were detected in addition to the bacterium *Escherichia coli* and other types of fungi.

Due to the presence of bacteria and fungi, antibiotic treatment was initiated with broad-spectrum antibiotics and then according to the antibiogram, specific to each type of bacteria. The most common class of antibiotics used was nitroimidazole, which was followed by third-generation cephalosporins, carbapenems and glycopeptides. .

The need for increasingly complex antibiotic combinations was necessary in patients with renal comorbidity where it was proved that there was increased resistance of bacteria to the administered treatment. In patients with digestive disease but without kidney involvement, the number of combinations of antibiotics used was lower compared to the number of combinations of antibiotics used in patients with digestive disease and kidney damage. In patients with kidney disease who received combinations of group 3 antibiotics, Cephalosporins of the third generation, Carbapenemi and Glycopeptides, the number of days of hospitalization was increased, as was the

number of deaths. The highest values of the number of days of hospitalization were recorded in the case of antibiotic group 11 where we had combinations of Nitroimidazole with Cephalosporins of the third generation, Carbapenemi and Glycopeptides and there were the most deaths in both patients with associated kidney disease and those without associated kidney disease. The antibiotic treatment administered took into account the recommendations of international treatment guidelines for bacterial and fungal infections correlated with the patient's comorbidities. The most used antibiotic in the studied group was Metronidazole, antibiotic of the Nitroimidazole class, which was administered to 162 patients, in one or more combinations together with third-generation cephalosporins, Carbapenemi and Glycopeptides. Third generation cephalosporins were administered to 127 patients in one or more combinations, followed by Carbapenemi in 118 patients and glycopeptides in 89 patients in various combinations. Along with antibiotic treatment, antimycotic treatment was also administered, 15 patients in this group received triazole derivatives. A higher number of days of hospitalization and deaths was also recorded in patients with kidney disease and uremia above normal values, who received antibiotics of group 10, nitroimidazole with Cephalosporins of the third generation and, Carbapenemi

In the case of deceased patients, the most commonly used antibiotic was the Carbapenemian class in 31 cases, Nitroimidazole in 29 cases, in 25 cases Cephalosporins of the third generation and in 24 cases Glycopeptides were administered in one or more combinations. Only two patients in this group received fluoroquinolones, penicillins and lincosamides and only one patient received fluoroquinolones in a single combination for urinary tract infection.

Prolonged hospitalization, especially in intensive care units, associated comorbidities and recurrent infections, the patient's age, repeated and prolonged treatment with antibiotics and antisecretory drugs, but also invasive medical maneuvers with risk of nosocomial infections are some of the risk factors incriminated in the occurrence of *Escherichia coli* infections.

In study no 3, the antibacterial activity of silver nanoparticles was tested against several bacteria: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* code GR 0333, *Enterococcus faecalis* ATCC29212, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* code GR 8575 (rough colonies), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. The results indicated that the silver nanoparticles exhibit antibacterial activity proven by the appearance of the inhibition zone, different in size, in the studied bacteria.

In the case of *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 by testing the antibiotic class of beta-lactams, macrolides, lincosamides and silver nanoparticles, we obtained the following results: the tested antibiotics proved antibacterial effect, as proven by the size of the inhibition zone of over 10 mm in the case of penicillin and over 25 mm in the case of the other classes of antibiotics tested, and the silver nanoparticles solution more concentrated, of 100 µg/mL had an antibacterial effect superior to 10 µg/mL. Combinations of antibiotics with silver nanoparticles at a concentration of 100 µg/mL had a bactericidal effect superior to antibiotics or nanoparticle solution taken separately. The antibacterial effect of silver nanoparticles also depends on their amount applied to the culture medium plate, the area of inhibition is higher in case of application of 100 µL compared to application of a much smaller amount of solution (20µ L). When testing the same bacteria for aminoglycosides, the antibiotics tested proved antibacterial effect, the area of inhibition for each

antibiotic was over 20mm, but the combination of these and the solution of silver nanoparticles with a concentration of 10 µg/mL proved equally effective, although the antibacterial effect of silver nanoparticles 10 µg/mL was lower, less than 10 mm inhibition zone. Using the same antibiotics for testing, the inhibition zones for the antibiotic were the same as with the first plate, but the more concentrated silver nanoparticle solution developed a higher inhibition zone of 12 mm compared to the more diluted solution, which was only 9 mm. In the case of testing at the fluoroquinolone class of antibiotics, the inhibition zone was in all 3 cases greater than 20 mm and over 10 mm in the case of silver nanoparticles, proving the inhibitory effect of the antibiotic but also of silver nanoparticles. Here, too, the size of the inhibition zone was larger for combinations of silver nanoparticles and antibiotics tested, but in this case we did not achieve a synergistic effect between silver nanoparticle solutions and antibiotic discs, and the inhibition zone was larger for the 100 µg/mL silver nanoparticle solution, i.e. 13mm, compared to the 10 µg/mL solution, which had only 9mm. In the case of testing tetracyclines, sulfonamides, oxazolidinones and silver nanoparticles of 10 and 100 µg/mL we obtained inhibition zone values above 24 mm for the 3 antibiotics and 13 mm for the 100 µg/mL silver nanoparticles solution. We did not achieve synergistic effect between the antibiotics used and silver nanoparticle solutions in both concentrations.

In the case of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) the area of inhibition was much lower in the Penicillin 1 µg (6 mm) test and only 12 mm in the Cefotaxime 30 µg test compared to *S aureus*. Combining the tested antibiotics with the 10 µg/mL silver nanoparticle solution, the inhibitory effect is the same as the antibiotic, proving that the low concentration of silver nanoparticles shows a low inhibitory effect. In MRSA testing for macrolides, lincosamides and silver nanoparticles 10 µg/mL, the areas of inhibition obtained were small for erythromycin and its combination with silver nanoparticles (12 mm) and 31 and 32 mm for clindamycin and its combination with silver nanoparticles, respectively. In the case of testing aminoglycosides, silver nanoparticles and their combinations, we obtained increased inhibition zones for all antibiotics in this class, of about 30mm, but by combining with low-concentration silver nanoparticles the inhibitory effect was not greater. In testing fluoroquinolones, silver nanoparticles and their combinations, we obtained increased inhibition zones for all antibiotics of this class tested but when combined with the solution of silver nanoparticles of low concentration the area of inhibition was not relevantly increased, proving as in the case of aminoglycosides that it is not effective. In the case of penicillins, glycopeptides, cephalosporins of the second generation and silver nanoparticles 100 µg/mL, inhibition zones above 15 mm for glycopeptides, 12 mm for second generation cephalosporins and 16 mm for more concentrated silver nanoparticles were obtained, compared to 6 mm for silver nanoparticles solution with a concentration of 10 µg/mL, proving that increasing the concentration of the solution leads to a directly proportional increase in the zone of inhibition. Penicillin developed the smallest area of inhibition (6 mm) on this culture plate.

When testing the bacterium *Escherichia coli* at the fluoroquinolone antibiotic class, we obtained inhibition zones over 25 mm for all 3 tested antibiotics and an inhibition zone of 14 mm for silver nanoparticles 100 µg / mL, proving the efficiency of the tested antibiotics but also of the more concentrated solution of silver nanoparticles and synergism is observed between silver nanoparticles and ciprofloxacin. When tested with aminoglycosides and silver nanoparticles, we

obtained values above 18 mm for antibiotics and 13 mm for silver nanoparticles. We obtained the same value of 13 mm of the inhibition zone in the case of *E coli* testing on silver nanoparticles 100 µg/mL with betalactamines, where the values of the inhibition zone were 17 mm for Ampicillin 10 µg and for Amoxicillin 30 µg the inhibition zone was 20 mm.

The management of infections caused by multidrug-resistant bacteria poses a huge challenge due to the limitation of conventional systemic delivery of antibiotics due to local ischemia, poor irrigation and the presence of tissue necrosis. In the case of wounds infected with multiresistant germs, antibiotic penetration into these areas is limited due to poor vascularization and thickness of the capsular wall, which often makes penetration absolutely impossible, even if high plasma concentrations of antibiotics are used.

The administration of antibiotics in high doses greatly increases their toxicity, especially in the liver, kidney and brain, and these toxic effects can aggravate existing comorbidities and lead to worsening of the patient's condition or even death.

Silver nanoparticles demonstrate better antibacterial activity against *E coli* compared to *S aureus*, and their administration may become an alternative to synthetic antimicrobials in the fight against multidrug-resistant bacteria. Analyzing the antibacterial activity of silver nanoparticles of different concentrations and different antibiotics for *S aureus* and *E coli*, the area of inhibition was different, demonstrating that bacteria from different groups (gram positive and gram negative) react differently to different antibiotics.

## **GENERAL DISCUSSIONS**

The concept of this thesis started from the fact that standard therapy in bacterial wound infections produced by multiresistant germs such as MRSA and *Escherichia coli* is treated with antibiotics of different classes according to the antibiogram and associated comorbidities of the infected patient. At the same time, studying the literature, I noticed that an increasing number of germs tend to develop resistance to many of the existing antibiotics currently used. The existence of standardized treatment protocols for multidrug-resistant bacteria is well defined and tends to be applied correctly in many healthcare facilities around the world. As nosocomial infections generate huge costs in health systems both in developed countries and especially in poorer countries, morbidity and mortality in these cases is particularly high. Starting from this, we developed 2 studies in which we followed on a large group of patients the effects of bacterial-staphylococcal and *E coli* infections, as well as the antibiotic treatment administered to these patients and in the 3rd study we conducted experimental research, *in vitro*, in the use of silver nanoparticles that could be used in the future as a safe and viable treatment method in treating infections caused by multiresistant germs which annually generates huge costs but also deaths among these patients.

The results of this study may form the basis for future research, and by solving the problems of stability, compatibility and low toxicity on living organisms, new drugs can be obtained to solve bacterial multiresistance.

## GENERAL CONCLUSIONS

The first study of this thesis followed the evolution of 34 from which the bacterium of the genus *Staphylococcus* was highlighted and we analyzed by appropriate statistical methods their evolution during hospitalization. The purpose of this study was to validate the hypothesis that bacterial infections and staphylococcal infection increase the incidence of complications, increase the duration of hospitalization and its costs, and increase morbidity and mortality of these patients.

The study showed that overuse and unjustified administration of antibiotics led to the emergence of antimicrobial resistance and multidrug-resistant bacteria. Glycopeptides remain the primary antibiotics for these infections, but other classes of antibiotics have also proven their effectiveness in the treatment of these infections. And in this study, the mortality of patients with severe diseases in which staph infections were detected was high, over 40%, the duration of prolonged hospitalization and high treatment costs.

In the 2nd study, he followed the evolution of 201 patients who had *Escherichia coli*. This bacterium has an extremely varied genome, is most commonly found in digestive and urinary tract infections, and has an important epidemiological impact on population health worldwide. Treatment of this infection requires taking one or more classes of antibiotics, which prolongs the duration of hospitalization and increases treatment costs. In the case of patients in the studied group, mortality was 17.5%, the male sex being more affected compared to the female sex and was given by the complications of comorbidities recorded in these patients in whom the infections produced by *Escherichia coli* along with other bacteria and fungi were highlighted. The antibiotic treatment administered to patients in the studied group included one or more classes of antibiotics, the most commonly used antibiotic was Metronidazole from the Nitroimidazole class, followed by Cephalosporins of the third generation, Carbapenemi and Glycopeptides in different combinations, according to antibiograms and comorbidities of patients throughout the hospitalization period.

The 3rd study represents an experimental research trying to prove the antibacterial effect of silver nanoparticles on some bacterial cell cultures of *Staphylococcus aureus*, MRSA and *Escherichia coli*. The combination of silver nanoparticles with antibiotics shows that the bactericidal effect increases significantly, as evidenced by the size of the inhibition zone determined in the case of the two bacteria studied.

This confirms the applicability of these nanomaterials in the pharmacology industry, which is facing real challenges due to the emergence of microbial resistance to many of the bacteria and fungi affecting human and animal organisms. As recent studies and research in the literature show, *in vivo* studies are still needed to develop biocompatibility and reduce nanoparticle toxicity to cells.

Combining silver nanoparticles with different classes of antibiotics may increase the antibacterial effect and produce larger areas of inhibition compared to aqueous herbal solution or uncombined silver nanoparticles in different concentrations.

## **ORIGINALITY AND INNOVATIVE CONTRIBUTIONS OF THE THESIS**

The doctoral thesis "Multimodal nanotechnologically mediated therapy of surgical wounds infected with multiresistant germs" is original through the chosen theme, a topic of real interest due to the emergence of microbial resistance to an increasing number of bacteria and fungi that endanger patients' lives, increase hospitalization costs and increase morbidity and mortality in many cases. Through his studies, he makes contributions that highlight the importance of appropriate treatment, according to international guidelines for the treatment of infections caused by multidrug-resistant bacteria such as MRSA and E coli, which raise serious public health problems worldwide, both in developed countries and especially in poorer countries through the huge costs generated by treatment.

Multidrug-resistant bacteria have emerged as a result of excessive and uncontrolled antibiotic use both in hospitals and in community settings, both in humans and animals. In vitro research demonstrates the ability of nanoparticles to become antibacterial agents superior to classical antibiotics, and combining them with antibiotic molecules significantly increases their antibacterial effect.

Although nanotechnology is in its infancy, some biocompatibility and toxicity issues remain to be solved, which, through further in vivo research, will make these nanomaterials the medicines of the future.