

Assessment of the Correlation Between Biofilm Formation and Resistance to Various Classes of Beta-Lactam Antibiotics

Somayeh Karamollahi ¹ , Moein Nikravan ^{1,2} , Parisa Asadollahi ¹ , Sobhan Ghafourian ² , Abbas Maleki ² , Hamid Heidari ³ , Hossein Kazemian ^{1,2*} 

¹ Dept of Microbiology, Faculty of Medicine, Ilam University of Medical Sciences, Ilam, Iran

² Clinical Microbiology Research Center, Ilam University of Medical Sciences, Ilam, Iran

³ Dept of Microbiology, Faculty of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

Article Info

Article type:

Research article

Article History:

Received: 23 October 2023

Revised: 15 November 2023

Accepted: 18 November 2023

Published Online: 30 December 2023

* Correspondence to:

Hossein Kazemian

Dept of Microbiology, Faculty of Medicine, Ilam University of Medical Sciences, Ilam, Iran

Email:

h.kazemian@outlook.com

ABSTRACT

Introduction: Bacterial biofilm assumes importance across various contexts, including chronic human infections, dental plaque, and infections associated with foreign bodies such as catheters. *Pseudomonas aeruginosa*, recognized for its biofilm-forming capacity, is implicated in the onset of diverse infections. This study aims to explore the correlation between biofilm production and resistance to distinct classes of beta-lactam antibiotics.

Material & Methods: In this cross-sectional investigation, 113 wound samples from burn patients admitted to Tehran and Ahvaz hospitals in 2020 were collected. *Pseudomonas aeruginosa* strains were identified using conventional biochemical and molecular methods. Antibiotic resistance profiles were elucidated employing the disk diffusion method, while beta-lactamase genes were identified through polymerase chain reaction (PCR). Statistical analysis was conducted using SPSS 20 software.

Results: Forty isolates of *P. aeruginosa*, all exhibiting biofilm-producing capabilities, were identified. Carbapenem resistance manifested in 16 isolates, with the predominant beta-lactamase genes being *bla*_{TEM} (15 isolates), *bla*_{VIM} (12 isolates), and *bla*_{CTX-M} (8 isolates). The highest resistance was observed against cefotaxime, cefazolin, meropenem, imipenem, and piperacillin, with 16 strains displaying resistance to these antibiotics. In the examination of carbapenemase-producing isolates (40% of the isolates), robust adhesion capabilities were consistently observed, and none lacked biofilm formation.

Discussion & Conclusion: Significant antibiotic resistance, particularly carbapenem resistance, was identified among *P. aeruginosa* isolates causing burn wound infections. The combination of carbapenem resistance with biofilm production poses a formidable challenge in managing infectious diseases. It is suggested that, in addition to combating microbial resistance, efforts should be directed towards the eradication of bacterial biofilm for effective treatment.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, biofilm, Carbapenem

How to cite this paper

Karamollahi S, Nikravan M, Asadollahi P, Ghafourian S, Maleki A, Heidari H, et al. Assessment of the Correlation Between Biofilm Formation and Resistance to Various Classes of Beta-Lactam Antibiotics. Journal of Ilam University of Medical Sciences. 2023;31(5): 109-120.



بررسی ارتباط میان قدرت تولید بیوفیلم و مقاومت به کلاس‌های مختلفی از آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام

سمیه کرم الهی^۱، معین نیک روان^۱، پریسا اسداللهی^۱، سبحان غفوریان^۲، عباس ملکی^۲، حمید حیدری^۳، حسین کاظمیان^{۱*}

^۱ گروه میکروبی شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام، ایلام، ایران

^۲ مرکز تحقیقات میکروبی شناسی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام، ایلام، ایران

^۳ گروه میکروبی شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

نوع مقاله: پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۸/۰۱

تاریخ ویرایش: ۱۴۰۲/۰۸/۲۴

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۸/۲۷

تاریخ انتشار: ۱۴۰۲/۱۰/۰۹

مقدمه: بیوفیلم باکتریایی از جنبه‌های مختلفی مانند بیماری‌های وابسته به عفونت‌های مزمن انسانی، پلاک دندان، عفونت اجسام خارجی مانند کاتترها و سایر بیماری‌های عفونی اهمیت دارد. سودوموناس آئروژینوزا یکی از عوامل عفونی تولیدکننده بیوفیلم است که باعث ایجاد عفونت‌های شدیدی می‌شود؛ بنابراین، هدف از این مطالعه بررسی ارتباط میان قدرت تولید بیوفیلم و مقاومت به کلاس‌های مختلفی از آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه مقطعی، تعداد ۱۱۳ نمونه از زخم بیماران سوختگی بستری در بیمارستان‌های تهران و اهواز در سال ۱۴۰۰ جمع‌آوری گردید. جدایه‌های سودوموناس آئروژینوزا با روش‌های استاندارد بیوشیمیایی و مولکولی تشخیص داده شدند. الگوهای مقاومت آنتی‌بیوتیکی با روش دیسک دیفیوژن و ژن‌های بتالاکتاماز با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) شناسایی گردیدند. نتایج با استفاده از نرم‌افزار SPSS vol.2020 آنالیز شد.

یافته‌های پژوهش: ۴۰ جدایه سودوموناس آئروژینوزا شناسایی گردید و همه این جدایه‌ها تولیدکننده بیوفیلم بودند. مقاومت کاربایتم در ۱۶ جدایه تشخیص داده شد و *bla*_{TEM} (۱۵ جدایه)، *bla*_{VIM} (۱۲ جدایه) و *bla*_{CTX-M} (۸ جدایه) شایع‌ترین ژن‌های بتالاکتاماز بودند. بیشترین مقاومت به سفوتاکسیم، سفنازیدیم، مروپنم، ایمپنم و پیراسیلین مشاهده گردید و ۱۶ جدایه به این آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم بودند. در بررسی نهایی جدایه‌های مولد کاربایتماز (۴۰ درصد از جدایه‌ها) توانایی اتصال قوی داشتند و هیچ‌کدام از جدایه‌ها فاقد توانایی تشکیل بیوفیلم نبودند.

بحث و نتیجه‌گیری: مقاومت آنتی‌بیوتیکی به‌ویژه مقاومت به کاربایتم، در میان جدایه‌های سودوموناس آئروژینوزا که عامل عفونت زخم‌های سوختگی هستند، قابل توجه بود. ترکیب مقاومت کاربایتم با تولید بیوفیلم می‌تواند به عفونت‌های شدید و دشوار منجر شود. برای درمان بیماری‌های عفونی پیشنهاد می‌گردد که علاوه بر مبارزه با مقاومت‌های میکروبی، می‌بایست به دنبال راهی برای از بین بردن بیوفیلم باکتریایی نیز بود.

واژه‌های کلیدی: بیوفیلم، سودوموناس آئروژینوزا، مقاومت‌های میکروبی

استناد: کرم الهی سمیه، نیک‌روان معین، اسداللهی پریسا، غفوریان سبحان، ملکی عباس، حیدری حمید و دیگران. بررسی ارتباط میان قدرت تولید بیوفیلم و مقاومت به کلاس‌های مختلفی از آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام. مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام، آذر ۱۴۰۲؛ ۳۱(۵): ۱۰۹-۱۲۰.



سودوموناس آئروژینوزا به عنوان یکی از شایع‌ترین عوامل بیماری‌زای انسانی در جنس سودوموناس شناخته می‌شود. این باکتری سومین عامل عفونت در بیمارستان‌ها، پس از استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیاکلاسی است (۱). عفونت‌های ناشی از سودوموناس آئروژینوزا به ویژه عفونت‌های زخم سوختگی، اهمیت بسیار بالایی دارد که سالانه سبب مرگ‌ومیر فراوانی می‌گردد. با وجود این، اطلاعات کافی درباره الگوهای مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها، ژن‌های سایتوتوکسین و توانایی تولید بیوفیلم توسط جدایه‌های این باکتری که از عفونت‌های سوختگی جدا شده‌اند، محدود است (۲).

بیوفیلم به اجتماعاتی از باکتری‌ها اطلاق می‌شود که به یک سطح متصل می‌گردند و لایه‌ای ژله‌ای می‌سازند. این لایه در شرایطی شکل می‌گیرد که باکتری‌ها تحت تنش‌های مختلفی از جمله فقر مواد غذایی و فشار آنتی‌بیوتیکی قرار داشته باشند. تشکیل بیوفیلم به منظور محافظت باکتری‌ها در برابر تنش‌های محیطی شکل می‌گیرد و شامل مراحل متعددی است (۳). بیوفیلم‌ها ساختارهای چندشکلی دارند؛ به این معنی که شامل فضاهای خالی، مجراها، حفره‌ها، منافذ و رشته‌ها هستند. حفره‌های موجود در بیوفیلم عملکرد مهمی در انتقال مواد غذایی به لایه‌های زیرین دارند. در این ساختار، باکتری‌ها با آرایش‌های خوشه‌ای یا میکروکلونی‌هایی هستند که توسط حفره‌های جداگانه از هم مجزا می‌شوند. در اجتماع میکروبی داخل بیوفیلم، واکنش‌های شیمیایی مانند اکسیداسیون و احیا انجام می‌گردد، به این صورت که در یک توده بیوفیلمی، جمعیت میکروبی تغیردهنده‌های الکترونی را اکسید می‌کند و باعث کاهش گیرنده‌های الکترونی می‌شود و پتانسیل احیا را کاهش می‌دهد. محققان عقیده دارند، هرچه لایه بیوفیلمی ضخیم‌تر باشد، عمقی که یک گیرنده الکترونی طی می‌کند، با گیرنده‌های دیگر تداخل پیدا می‌یابد (۴)؛ بنابراین، در یک محیط طبیعی، توده‌های میکروبی متنوع‌تر موفق‌تر عمل می‌کنند.

سودوموناس آئروژینوزا به رده‌ای منحصر به فرد از

باکتری‌های گرم منفی تعلق دارد که به صورت ژنوتیپی به راحتی تغییر شکل می‌یابد (۵). ظهور جهانی سویه‌های مقاوم به همه آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام شامل کاربامپنم، نشان‌دهنده توانایی بالای این ارگانیزم برای پاسخ سریع به تغییرات در مقابل فشارهای انتخابی محیط است. سازوکارهای مختلفی در ایجاد مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام شامل سازوکارهای آنزیمی و آنزیم‌های هیدرولیزکننده آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام (بتالاکتاماز) و سازوکارهای غیر آنزیمی دخیل است که سبب تغییر در نفوذپذیری غشا از طریق کانال‌ها و یا افزایش بیان پروتئین‌های غشای بیرونی (Outer Membrane Proteins) و کاهش یا از دست دادن بیان افلاکس پمپ‌ها (efflux pumps) می‌شود (۶). تحقیقات اخیر نشان می‌دهد که کسب شاخص‌های بیگانه و افزایش بیان سازوکارهای مرتبط با مقاومت آنتی‌بیوتیکی از مهارت‌های حیاتی سودوموناس آئروژینوزا است که در طول زمان به آن دست یافته‌اند. این مسئله برای درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری، از اهمیت بسیار بالایی برخوردار است (۷).

امروزه، سودوموناس آئروژینوزا یکی از عوامل اصلی عفونت در بیمارستان‌ها است. با توجه به اینکه عفونت‌های سوختگی باعث مرگ‌ومیر بسیاری از افراد می‌شوند، تعیین عواملی که به مقاومت این باکتری نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها و توانایی تشکیل بیوفیلم مرتبط است، امری اساسی برای بهبود رویکردهای پیشگیری و درمانی در مقابل این عفونت‌ها است. هدف اصلی این مقاله بررسی ارتباط میان تولید بیوفیلم و مقاومت به کلاس‌های مختلف کاربامپنم در جدایه‌های سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از عفونت‌های زخم سوختگی، به منظور بهبود درک سازوکارهای مقاومت و عفونت‌زایی سودوموناس آئروژینوزا و تعیین روش‌های مؤثرتر در پیشگیری و درمان آن‌ها است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه: پژوهش حاضر از نوع توصیفی - مقطعی است که در طول بازه زمانی ۶ ماهه، در سال ۱۴۰۰ انجام شد. این مطالعه توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی ایلام با کد IR.MEDILAM.REC.1399.237 مورد

تایید قرار گرفت. در مجموع، ۱۱۳ نمونه بالینی از عفونت زخم سوختگی بیماران مراجعه کننده به بیمارستان های سوانح سوختگی تهران و اهواز جمع آوری گردید. نمونه ها پس از انتقال به آزمایشگاه میکروب شناسی دانشگاه علوم پزشکی ایلام، برای تشخیص فنوتیپی روی محیط های مگکانکی آگار و بلاد آگار حاوی ۵ درصد خون گوسفندی کشت داده و در ۳۷ درجه سانتی گراد، به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. شناسایی اولیه جدایه ها به روش فنوتیپی و بر اساس ویژگی بیوشیمیایی و بر مبنای دستورالعمل های استاندارد صورت گرفت. در این مطالعه، اطلاعات جمع آوری شده با استفاده از نرم افزار SPSS vol.2020 تجزیه و تحلیل گردید.

آزمون حساسیت آنتی بیوتیکی: در این مطالعه، ارزیابی حساسیت ضد میکروبی جدایه ها با استفاده از روش استاندارد دیسک دیفیوژن بر روی محیط کشت مولر هیتون آگار (Merk، آلمان)، با استفاده از دیسک های سفوتا کسیم (۳۰ میکرو گرم)، سفنازیدیم (۳۰ میکرو گرم)، پیراسیلین (۳۰ میکرو گرم)، ایمپنم (۱۰ میکرو گرم)، مروپنم (۱۰ میکرو گرم) تهیه شده از شرکت (پادتن طب) صورت گرفت. برای انجام این کار، پس از ایزوله کردن باکتری، مقداری از کلونی باکتری به وسیله انس برداشته و در سرم فیزیولوژی استریل حل شد و پس از تهیه سوسپانسیون میکروبی معادل غلظت نیم مکفارلند، به وسیله سواب روی محیط کشت مولر هیتون آگار به صورت چمنی کشت گردید و پس از انکوبه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، قطر هاله های عدم رشد یافته توسط خطکش اندازه گیری شد. از ATCC25922 Escherichia coli به عنوان کنترل کیفی برای ارزیابی صحت قطر هاله عدم رشد آنتی بیوتیک، طبق دستورالعمل CLSI 2020 استفاده گردید.

شناسایی فنوتیپی تولید بتالاکتاماز (ESBL)، متالوبتالاکتاماز (MBL) و کارباپنماز؛ بتالاکتاماز: آزمون فنوتیپی برای شناسایی آنزیم های بتالاکتاماز با استفاده از دیسک سفنازیدیم (۳۰ میکرو گرم) به تنهایی و دیسک حاوی سفنازیدیم و کلاوولانیک اسید (۱۰/۳۰ میکرو گرم) روی محیط مولر هیتون آگار مطابق استانداردهای CLSI 2020

انجام شد. پس از ۲۴-۱۸ ساعت، اگر قطر هاله عدم رشد در اطراف دیسک حاوی سفنازیدیم و کلاوولانیک اسید حداقل ۵ میلی متر و بیشتر از دیسک حاوی سفنازیدیم به تنهایی بود، آزمایش مثبت در نظر گرفته شد (۸).

متالوبتالاکتاماز: در این روش، از باکتری هایی که نسبت به آنتی بیوتیک های کارباپنم مقاوم و یا نیمه حساس بودند، سوسپانسیون نیم مکفارلند تهیه گردید؛ سپس روی محیط مولر هیتون آگار کشت داده شد. برای شناسایی متالوبتالاکتامازها از دیسک ایمپنم (۱۰ میکرو گرم) به تنهایی و در مجاورت یک دیسک حاوی EDTA (ایمی پنم-EDTA) استفاده گردید؛ سپس پلیت ها به مدت ۲۴-۱۸ ساعت، در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. افزایش ۹ میلی متری قطر هاله عدم رشد در اطراف دیسک (ایمی پنم-EDTA) نشان دهنده حضور متالوبتالاکتاماز بود (۹).

کارباپنماز: جدایه های سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به آنتی بیوتیک های کارباپنم از نظر حضور کارباپنمازها بررسی گردید. بر اساس CLSI 2020، در صورتی که قطر هاله عدم رشد اطراف دیسک مروپنم (۱۰ میکرو گرم) بین ۶ الی ۱۵ میلی متر باشد، به عنوان کارباپنماز مثبت در نظر گرفته می شود و اگر قطر هاله عدم رشد اطراف دیسک مروپنم بزرگ تر یا مساوی ۱۹ میلی متر باشد، به عنوان کارباپنماز منفی در نظر گرفته می شود (۱۰).

آزمون بیوفیلیم با روش میکروتیتر پلیت: در این مطالعه، از روش فنوتیپی میکروتیتر پلیت برای تعیین قدرت تشکیل بیوفیلیم در باکتری سودوموناس آئروژینوزا استفاده گردید. در این روش، جدایه باکتری جمع آوری شده به مدت یک شبانه روز در دمای ۳۷ درجه انکوبه شدند؛ سپس تک کلونی ها از هر جدایه سودوموناس آئروژینوزا به محیط TSB (Tryptic Soy Broth) با ۲ درصد گلوکز منتقل گردیدند و در ادامه، سوسپانسیون میکروبی آماده در طول موج تعیین شده به میکروپلیتهای ۹۶ خانه ای منتقل شد، به این صورت که در داخل هر چاهک، ۱۸۰ میکرو لیتر از محیط TSB ریخته و به آن ۲۰ میکرو لیتر از سوسپانسیون میکروبی

واکنش زنجیره پلیمرز (PCR): استخراج DNA به روش جوشاندن انجام گردید (۱۲). پس از این مرحله، لوله‌ها از بنماری خارج و پس از چند دقیقه خشک شدن، به رسوب ته میکروتیوب‌ها ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل اضافه شد و در دور ۱۰۰۰۰ به مدت دو دقیقه سانتریفیوژ گردید. در مرحله پایانی، ۱۰۰ میکرولیتر از مایع رویی برداشته شد و به یک میکروتیوب ۰/۲ منتقل گردید. این مایع تا زمان آزمایش PCR در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. DNA استخراج شده از نظر کمی و کیفی، با استفاده از دو روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز روی ژل آگارز بررسی گردید.

واکنش PCR و تعیین توالی نواحی کدکننده آنزیم‌های ESBL، متالوبتالاکتاماز و کارباپنماز: ارزیابی ژنوتیپی به منظور شناسایی ژن‌های *bla_{SHV}*، *bla_{TEM}*، *bla_{CTX-M}*، *bla_{VIM}*، *bla_{IMP}*، *bla_{NDM}*، *bla_{oxa-23}*، *bla_{oxa-48}*، *bla_{oxa-11}* در جدایه‌های مطالعه‌شده، از روش PCR با استفاده از زوج پرایمرهای نشان داده‌شده در جدول شماره ۱ استفاده گردید.

اضافه و برای مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. محتوای چاهک‌ها به آرامی آسپیره گردیدند و با سرم فیزیولوژی استریل شستشو داده شدند. پس از شستشو، در هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر متانول ۹۹ درصد اضافه گردید و به مدت ۱۵ دقیقه، برای اتصال باکتری‌ها به کف و جداره چاهک، در دمای اتاق قرار داده شدند. در مرحله بعد، پس از شستشو و حذف متانول، به هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر کریستال ویوله ۱ درصد اضافه گردید و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. در ادامه و به منظور حذف رنگ اضافه، پلیت به آرامی با آب مقطر سه بار شستشو داده شد و در نهایت، ۲۰۰ میکرولیتر اسید استیک گلاسیال ۳۳ درصد به هر کدام از چاهک‌ها اضافه گردید و به مدت ۳۰ دقیقه، میکروپلیت در دمای اتاق قرار داده شد و در ۵۷۰ نانومتر جذب نوری چاهک‌ها با استفاده از الیزا ریدر اندازه‌گیری گردید (۱۱).

نمونه کنترل منفی در این روش، TSB حاوی ۱ درصد گلوکز بود. برای اطمینان از صحت کار برای جدایه‌های مطالعه‌شده، جذب نوری هریک از جدایه‌ها سه مرتبه بررسی شد.

جدول شماره ۱. توالی پرایمرهای استفاده‌شده برای تکثیر ژن‌های بتالاکتاماز ESBL، MBL و کارباپنماز

Gene	Sequence (5'→3')	Amplicon Siza (bp)	Tm	reference
<i>bla_{SHV}</i>	F:GCCCCGGTTATTCTTATTTGTCGC R:TCTTCCGATGCCGCCAGTCA	۱۰۱۳bp	۵۵	(۱۳)
<i>bla_{TEM}</i>	F:TCCGCTCATGAGACAATAACC R:ATAATACCGCACCACATAGCAG	۳۰۰bp	۵۵	(۱۳)
<i>bla_{CTX-M}</i>	F:TTTGCATGTGTCAGTACCAGTAA R:CGATATCGTTGGTGGTGCCATA	۴۵۵bp	۵۶	(۱۳)
<i>bla_{VIM}</i>	F:GATGGTGTGGTGCATATA R:CGAATGCGCAGCACCAG	۳۹۰bp	۵۴	(۱۳)
<i>bla_{IMP}</i>	F:AGCCCATAGTTAACCCCGCC R:CTGGCTTAATTCTCAATCCATCCC	۱۱۴bp	۵۳	(۱۳)
<i>bla_{NDM}</i>	F:GGTTGGCGATCTGGTTTTC R:CGGAATGGCTCATCACGATC	۶۲۱bp	۵۶	(۱۳)
<i>bla_{oxa-23}</i>	F:TGGAAGGGCGAGAAAAGGTC R:TTGCCAACCCAGTCTTTCCA	۴۰۰bp	۵۵	(۱۳)
<i>bla_{oxa-48}</i>	F:GCGTGGTTAAGGATGAACAC R:CATCAAGTTCAACCCAACCG	۴۳۸bp	۵۵	(۱۳)
<i>bla_{oxa-11}</i>	F:CGAGTACGGCATTAGCTGGT R:CTCTGGCTTCCGTCAT	۲۵۰bp	۵۶	(۱۳)

در این مطالعه با استفاده از پرایمرهای اختصاصی، واکنش ۲۵ میکرولیتر بود. حجم پرایمرها و DNA الگو که تکثیر و شناسایی ژن‌های مدنظر صورت گرفت. شایان ذکر است که برای انجام واکنش‌های PCR، حجم نهایی هر باید به مسترمیکس اضافه شود، در جدول شماره ۲ ارائه شده است.

جدول شماره ۲. شرایط انجام واکنش PCR برای هر کدام از ژن‌های بتالاکتاماز ESBL، MBL و کارباپنماز.

Gene	Initial Denaturation	Denaturation	Annealing	Extension	Cycle	Final Extension
<i>bla_{SHV}</i>	۹۵ °C- ۵ min	۹۵°C- ۴۵s	۵۵°C- ۴۵s	۷۲°C- ۱min	۳۰	۷۲°C-۱۰min
<i>bla_{TEM}</i>	۹۵ °C- 5 min	۹۵°C- ۴۵s	۵۵°C- ۴۵s	۷۲°C- ۱min	۳۰	۷۲°C-۱۰min
<i>bla_{CTX-M}</i>	۹۵ °C- ۵ min	۹۵°C- ۴۵s	۵۶°C- ۴۵s	۷۲°C- ۱min	۳۰	۷۲°C-۱۰min
<i>bla_{VIM}</i>	۹۴ °C- ۱۰ min	۹۴°C- ۳۰s	۵۴°C- ۳۵s	۷۲°C- ۳۰s	۳۶	۷۲°C-۵min
<i>bla_{IMP}</i>	۹۵°C- ۱ min	۹۵°C- ۳۵s	۵۳°C- ۳۰s	۷۲°C- ۲۵s	۳۱	۷۲°C-۷min
<i>bla_{NDM}</i>	۹۵°C- ۵ min	۹۵°C- ۳۵s	۵۶°C- ۵۰s	۷۲°C- ۴۵s	۳۵	۷۲°C-۶min
<i>bla_{oxa-23}</i>	۹۵°C- ۵ min	۹۵°C-۴۵s	۵۵°C- ۴۵s	۷۲°C- ۱min	۳۰	۷۲°C-۱۰min
<i>bla_{oxa-48}</i>	۹۵°C- ۵ min	۹۵°C-۴۵s	۵۵°C- ۴۵s	۷۲°C- ۱min	۳۰	۷۲°C-۱۰min
<i>bla_{oxa-11}</i>	۹۵°C- ۵ min	۹۵°C-۴۵s	۵۶°C- ۴۵s	۷۲°C- ۱min	۳۰	۷۲°C-۱۰min

یافته‌های پژوهش

آنتی‌بیوگرام به روش دیسک دیفیوژن در مورد نمونه‌ها نشان داد، بیشترین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی به سفالوسپوینهای نسل ۳ و کارباپنماها ۴۰ درصد بود (جدول شماره ۳).

از میان ۱۱۳ نمونه سوختگی جمع‌آوری شده در طول بازه زمانی ۶ ماه، ۴۰ جدایه (۳۰ درصد) سودوموناس آئروژینوزا شناسایی شد. همه جدایه‌ها از نظر آزمون‌های تشخیصی بیوشیمیایی، الگوی یکسانی داشتند. نتایج آزمون

جدول شماره ۳. نتایج تعیین حساسیت ضد میکروبی به روش دیسک دیفیوژن

نام آنتی‌بیوتیک	حساس	مقاوم
سفتازیدیم	۲۴ (۶۰ درصد)	۱۶ (۴۰ درصد)
سفتو تاکسیم	۲۴ (۶۰ درصد)	۱۶ (۴۰ درصد)
پیپراسیلین	۲۴ (۶۰ درصد)	۱۶ (۴۰ درصد)
ایمی‌پنم	۲۴ (۶۰ درصد)	۱۶ (۴۰ درصد)
مروپنم	۲۴ (۶۰ درصد)	۱۶ (۴۰ درصد)

آنزیم‌های متالوبتالاکتاماز و ۱۶ جدایه (۴۰ درصد) مولد آنزیم‌های کارباپنماز بودند.

نتایج فراوانی ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جدایه‌های مقاوم سودوموناس آئروژینوزا: از میان ۴۰ جدایه سودوموناس آئروژینوزا که به صورت فنوتیپی نیز ارزیابی شده بودند، از نظر ژنوتیپی در ارتباط با ژن‌های ESBL متعلق به بتالاکتامازهای کلاس A، *bla_{SHV}*، *bla_{CTX-M}* و *bla_{TEM}*

نتایج آزمون‌های تأییدی فنوتیپی به روش دیسک ترکیبی به منظور بررسی حضور آنزیم‌های ESBL متالوبتالاکتاماز و کارباپنماز: از میان ۱۶ جدایه مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های سفالوسپورین‌های نسل ۳، همه جدایه‌ها بدون آنزیم‌های ESBL بودند و از میان ۱۶ جدایه مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های کارباپنم، ۱۲ جدایه (۳۰ درصد) از نظر آزمون تأییدی فنوتیپی به روش دیسک ترکیبی، مولد

D، 7 جدایه (۱۷/۵ درصد) از ۴۰ جدایه حاوی ژن *bla_{OXA}* بودند. باین حال، *bla_{OXA-11}* در میان جدایه‌ها شناسایی نشد. جزئیات در جدول شماره ۴ نشان داده شده و الگوی توزیع ژن‌ها در سراسر جدایه‌ها در جدول شماره ۵ فهرست گردیده است.

به ترتیب در ۶ جدایه (۱۵ درصد)، ۸ جدایه (۲۰ درصد) و ۱۵ جدایه (۳۷/۵ درصد) شناسایی گردیدند. در مورد متالوتالاکتاماز (کلاس B)، 12 جدایه (۳۰ درصد) از ۴۰ جدایه *bla_{VIM}* داشتند. از سوی دیگر، *bla_{NDM}* و *bla_{IMP}* در هیچ یک از جدایه‌ها شناسایی نشد. در مورد کارباپنماز (کلاس

جدول شماره ۴. توزیع ژن‌های مقاومت MBL، ESBL و کارباپنم در میان ۴۰ جدایه سودوموناس آئروژینوزا

	Class A beta-lactamases			Class B			Class D		
	<i>bla_{SHV}</i>	<i>bla_{TEM}</i>	<i>bla_{CTX-M}</i>	<i>bla_{IMP}</i>	<i>bla_{VIM}</i>	<i>bla_{NDM}</i>	<i>bla_{OXA-48}</i>	<i>bla_{OXA-11}</i>	<i>bla_{OXA-23}</i>
Positive	۶ (۱۵ درصد)	۱۵ (۳۷/۵ درصد)	۸ (۲۰ درصد)	-	۱۲ (۳۰ درصد)	-	۷ (۱۷/۵ درصد)	-	۱ (۲/۵ درصد)
Negative	۳۴ (۸۵ درصد)	۲۵ (۶۲/۵ درصد)	۳۲ (۸۰ درصد)	۴۰ (۱۰۰ درصد)	۲۸ (۷۰ درصد)	۴۰ (۱۰۰ درصد)	۹ (۸۲/۵ درصد)	۴۰ (۱۰۰ درصد)	۳۹ (۹۷/۵ درصد)

جدول شماره ۵. توزیع ژن‌های مختلف در سراسر جدایه‌ها

Organism	Number of isolates	Resistance	Beta-lactamases Classes
<i>P.aeruginosa</i> (N=40)	۲	<i>bla_{TEM}</i> , <i>bla_{SHV}</i> , <i>bla_{CTX-M}</i> + <i>bla_{VIM}</i>	A+B
	۳	<i>bla_{TEM}</i> + <i>bla_{VIM}</i>	A+B
	۲	<i>bla_{TEM}</i> + <i>bla_{VIM}</i> + <i>bla_{OXA-48}</i>	A+B+D
	۱	<i>bla_{SHV}</i> , <i>bla_{TEM}</i> + <i>bla_{VIM}</i>	A+B
	۱	<i>bla_{TEM}</i> , <i>bla_{CTX-M}</i> , <i>bla_{SHV}</i> + <i>bla_{OXA-23}</i>	A+D
	۱	<i>bla_{TEM}</i> , <i>bla_{SHV}</i> , <i>bla_{CTX-M}</i> + <i>bla_{VIM}</i> + <i>bla_{OXA-48}</i>	A+B+D
	۱	<i>bla_{TEM}</i> , <i>bla_{CTX-M}</i> + <i>bla_{VIM}</i>	A+B
	۱	<i>bla_{TEM}</i> , <i>bla_{CTX-M}</i> + <i>bla_{VIM}</i> + <i>bla_{OXA-48}</i>	A+B+D
	۱	<i>bla_{TEM}</i> + <i>bla_{OXA-48}</i>	A+D
	۱	<i>bla_{VIM}</i> + <i>bla_{OXA-48}</i>	B+D
۱	<i>bla_{TEM}</i> , <i>bla_{SHV}</i> + <i>bla_{OXA-48}</i>	A+D	

تجزیه و تحلیل کمی تولید بیوفیلیم، میانگین جذب نوری سه چاهک بیوفیلیم به عنوان (A) با چاهک کنترل به عنوان (AC) مقایسه شد و به صورت زیر محاسبه گردید:

$$A \leq AC$$

تشکیل نشدن بیوفیلیم:

$$AC < A \leq (2 \times AC)$$

نمونه‌های با بیوفیلیم ضعیف:

$$(2 \times AC) < A \leq (4 \times AC)$$

نمونه‌های با بیوفیلیم متوسط:

$$A > (4 \times AC)$$

نمونه‌های با بیوفیلیم قوی:

نتایج بررسی تشکیل بیوفیلیم ایزوله‌های جمع‌آوری شده سودوموناس آئروژینوزا: در بررسی نهایی جدایه‌های مولد بیوفیلیم در باکتری سودوموناس آئروژینوزا مطالعه شده به روش فنوتیپی، ۴۰ جدایه از نظر تشکیل بیوفیلیم بررسی گردید و نتایج در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه الیزا ریدر خوانش شد. پس از خوانش جذب نوری (OD) نتایج به روش CUT OFF به تفکیک مشخص گردید. برای

قوی نشان داد که از نظر آماری میان وجود ژن‌های کارباپنم‌زاد و تشکیل بیوفیلم ارتباط معنی‌داری وجود دارد ($P < 0.05$) (جدول شماره ۷).

۱۶ جدایه (۴۰ درصد) از جدایه‌ها توانایی اتصال قوی داشتند و هیچ‌کدام از جدایه‌ها بدون تشکیل بیوفیلم نبودند (جدول شماره ۶)؛ همچنین مقایسه حضور ژن‌های کارباپنم‌زاد در میان جدایه‌های سودوموناس آئروژینوزا تولیدکننده بیوفیلم

جدول شماره ۶. بررسی میزان تولید بیوفیلم به روش میکروتیتر پلِت در جدایه‌های سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از عفونت زخم سوختگی

توانایی تشکیل بیوفیلم	محاسبه میزان تولید بیوفیلم	OD نتایج میانگین حداکثر جذب نوری
قوی	$4 * OD < ODC$	۱۶ (درصد ۴۰)
متوسط	$2 * OD < ODC \leq 4 * OD$	۱۵ (درصد ۳۷/۵)
ضعیف	$2 * OD < ODC \leq OD$	۹ (درصد ۲۲/۵)
اتصال نداشتن	$Odc < OD$	۰

OD: چگالی نوری (کنترل منفی * 2 + SD میانگین کنترل منفی) (OD: ODC)

جدول شماره ۷. توزیع ژن‌های مختلف در سراسر جدایه‌های تولیدکننده بیوفیلم قوی

	Number of isolates	Resistance	Beta-lactamases Classes
Biofilm high	۲	<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{CTX-M} + <i>bla</i> _{VIM}	A+B
	۱	<i>bla</i> _{SHV} + <i>bla</i> _{TEM}	A
	۱	<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{CTX-M} + <i>bla</i> _{Oxa-23}	A+B +D
	۱	<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{CTX-M} + <i>bla</i> _{VIM} + <i>bla</i> _{Oxa-48}	A+B +D
	۱	<i>bla</i> _{TEM} + <i>bla</i> _{VIM} + <i>bla</i> _{Oxa-48}	A+B+D
	۱	<i>bla</i> _{TEM} + <i>bla</i> _{CTX-M} + <i>bla</i> _{Oxa-48}	A+ D
	۱	<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{CTX-M} + <i>bla</i> _{VIM}	A+B
	۱	<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{CTX-M} + <i>bla</i> _{VIM} + <i>bla</i> _{Oxa-48}	A+B +D
	۱	<i>bla</i> _{TEM} + <i>bla</i> _{Oxa-48}	A+D
	۱	<i>bla</i> _{VIM} + <i>bla</i> _{Oxa-48}	B+D

گردید (۱۵). در مطالعات انجام شده در ایران از جمله مطالعه‌های در شهر کرد و اصفهان، میزان مقاومت به ایمی‌پنم را به ترتیب ۵۸ درصد و ۹۴ درصد گزارش شد که این میزان نشان‌دهنده مقاومت بالاتری نسبت به کارباپنم در جدایه‌های سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از زخم‌های سوختگی است (۱۶). از عللی که می‌تواند سبب ایجاد این تفاوت‌ها در میزان مقاومت نسبت به سایر مطالعات ذکر شده شود، می‌توان منشأ عفونت در بیماران بستری را بیان کرد. با توجه به اینکه باکتری جدا شده در مطالعه ما، جدایه‌های بیمارستانی شناسایی شده از بیماران بستری در بخش سوختگی بودند، ممکن است منشأ عفونت، میکروفلورهای موجود در بدن شخص باشند؛ همچنین مطالعه‌ای که در هند انجام شد، نشان داد که ۶۱ درصد از جدایه‌های سودوموناس آئروژینوزا شناسایی شده از

بحث و نتیجه‌گیری

به علت افزایش روبه‌رشد مقاومت آنتی‌بیوتیکی در میان باکتری سودوموناس آئروژینوزا، اثر آنتی‌بیوتیک‌های مؤثر، در برابر عفونت‌های ناشی از این عامل فرصت‌طلب را خنثی می‌کند. در مطالعه حاضر، باکتری سودوموناس آئروژینوزا از زخم سوختگی بیماران بستری در بیمارستان شناسایی شدند و میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی و تولید بیوفیلم آن‌ها ارزیابی گردید. مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های کارباپنم مانند ایمی‌پنم و مروپنم ۴۰ درصد (۱۶ جدایه) بود، در حالی که این میزان در یک مطالعه انجام شده در لهستان به ترتیب ۴۱ درصد و ۶۱/۶ درصد بود (۱۴)؛ همچنین در مطالعات پیشین که در ایالات متحده انجام شده بود، مقاومت مروپنم (۷/۲۳ درصد) در بین جدایه‌های سودوموناس آئروژینوزا گزارش

مطالعات انجام شده از جمله مطالعه لیما و همکاران و مطالعه‌ای که در تبریز انجام شد، نشان داد که میزان تولید بیوفیلیم در جدایه‌های سودوموناس آئروژینوزا به ترتیب ۷۷/۵ درصد و ۶۳ درصد بود که از یافته ما حمایت می‌کند (۲۲)، (۲۱). در مقایسه میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی و تشکیل بیوفیلیم در سودوموناس آئروژینوزا و سایر پاتوژن‌های باکتریایی ارتباط مستقیمی وجود دارد و مطالعات متعدد نشان داده است که احتمال تشکیل بیوفیلیم در سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به چند دارو بیشتر است. از آنجا که در این سویه‌ها احتمال انتقال افقی ژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک بیشتر اتفاق می‌افتد؛ بنابراین، این باکتری‌ها بیوفیلیم‌های قوی‌تری را تشکیل می‌دهند. علاوه بر این، ایزوله‌های تشکیل دهنده بیوفیلیم مقادیر حداقل غلظت مهاري (MIC) متفاوتی نسبت به سلول‌های پلانکتون دارند. از این جهت لازم است که ترکیبی از آنتی‌بیوتیک‌ها برای حذف سویه‌های تشکیل دهنده بیوفیلیم استفاده شود (۲۳). از نتایج مهم این مطالعه پتانسیل بالای تولید بیوفیلیم در جدایه‌های مقاوم به درمان است و نشان داده شد که میزان تولید بیوفیلیم با مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام ارتباط مستقیمی دارد. از سویی، می‌توان به تعداد نمونه‌های استفاده شده در این مطالعه به‌عنوان محدودیت مهمی اشاره کرد؛ بنابراین، مطالعه روی تعداد بیشتری از جدایه‌ها اطلاعات بیشتری را هویدا می‌سازد.

میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی سودوموناس آئروژینوزا در میان نمونه‌های زخم سوختگی بسیار قابل توجه است؛ همچنین از آنجا که تولید بیوفیلیم عامل مؤثری در افزایش میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بین جدایه‌ها است؛ بنابراین، درمان جایگزین برای حذف بیوفیلیم می‌تواند به کاهش میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی در عفونت‌های سوختگی تهدید کننده حیات توسط سودوموناس آئروژینوزا کمک کند. برای درمان بیماری‌های عفونی پیشنهاد می‌شود که علاوه بر مبارزه با مقاومت‌های میکروبی، می‌بایست به دنبال راهی برای از بین بردن بیوفیلیم باکتریایی نیز بود.

سپاس‌گزاری

از جناب آقای دکتر بهروز صادقی کلانی که در امر

زخم‌های سوختگی، مقاوم به ایمی‌پنم بودند (۱۷). در مجموع، به نظر می‌رسد که شیوع مقاومت به کاربایم، به منطقه جغرافیایی مورد مطالعه بستگی دارد.

آنزیم‌های MBL و کارباینماز به‌عنوان اصلی‌ترین عامل مقاومت در برابر کاربایم در نظر گرفته می‌شوند. در مطالعه حاضر، ۱۲ جدایه (۳۰ درصد) از همه جدایه‌ها، برای کدگذاری حداقل یکی از آنزیم‌های MBL و ۱۶ جدایه (۴۰ درصد) کارباینماز مثبت بودند و وجود همزمان ژن‌های MBL، ESBL و کارباینماز در ۱۵ جدایه (۳۷/۵ درصد) مشاهده شد. وجود همزمان این آنزیم‌ها به سطوح بالایی از مقاومت به بتالاکتام‌ها منجر می‌شود؛ همچنین ژن‌های *bla*TEM، *bla*VIM و *bla*CTX-M شایع‌ترین ژن‌های بتالاکتاماز در میان جدایه‌ها بودند. در مطالعه پیمانی و همکاران، *bla*TEM-1 (۲۶/۷ درصد) و *bla*CTX-M (۱۷/۳ درصد) شایع‌ترین ژن‌ها بودند (۱۸)؛ همچنین در مطالعات دیگری از بیگم و همکاران و میرصالحیان و همکاران، میزان مقاومت به این ژن‌ها ۴۲/۳، ۳۷/۸ و ۳۹/۴ درصد بودند (۸، ۱۹).

در مطالعه ما، همه جدایه‌ها تولیدکننده بیوفیلیم بودند؛ اما شدت بیوفیلیم در میان آن‌ها متفاوت بود. پس از بررسی فراوانی ژن‌های ESBL، متالوبتالاکتاماز و کارباینماز و ارتباط آن‌ها با توانایی تشکیل بیوفیلیم، تنها میان حضور ژن‌های کارباینماز و تولید بیوفیلیم ارتباط معنادار وجود داشت ($P < 0.05$)؛ بنابراین، نتایج ما نشان داد که توانایی تشکیل بیوفیلیم در سویه‌هایی که تولیدکننده آنزیم کارباینماز هستند، بالاتر است. چنین ارتباطی ممکن است به این مسئله اشاره کند که سویه‌هایی که قادرند بیوفیلیم قوی تولید کنند، در اجتماع متراکم‌تر هستند و به این صورت، ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی مانند کارباینماز راحت‌تر انتقال می‌یابند. در مطالعه عباسعلی و همکاران، میزان شیوع سویه‌های تولیدکننده آنزیم بتالاکتاماز وسیع‌الطیف (۶۶/۶۶ درصد) بود که ۶۰ درصد جدایه‌ها بیوفیلیم قوی تشکیل می‌دادند. آنالیز نتایج آماری نشان داد که توانایی تشکیل بیوفیلیم قوی در سویه‌های تولیدکننده ESBL در مقایسه با سویه‌های بدون این آنزیم‌ها، بیشتر است (۲۰).

جمع آوری نمونه، این مطالعه را یاری کردند، کمال تقدیر و تشکر را داریم.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می نمایند که تعارض منافی وجود ندارد.

کد اخلاق

IR.MEDILAM.REC.1399.237

سهام نویسندگان

طراحی و سرپرستی مطالعه: حسین کاظمیان،؛ جمع آوری نمونه و انجام آزمایشات: معین نیک روان، پریسا اسداللهی؛ نگارش نسخه اولیه: سمیه کرم اللهی، سبحان غفوریان؛ تحلیل اطلاعات و اصلاح متن: عباس ملکی، حمید حیدری.

References

- Jaffe RI, Lane JD, Bates CW. Real-time identification of *Pseudomonas aeruginosa* direct from clinical samples using a rapid extraction method and polymerase chain reaction (PCR). *J Clin Lab Anal* 2001; 15:131-7. doi: 10.1002/jcla.1016.
- Qin X, Emerson J, Stapp J, Stapp L, Abe P, Burns JL. Use of real-time PCR with multiple targets to identify *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermenting gram-negative bacilli from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 2003; 41:4312-7. doi: 10.1128/JCM.41.9.4312-4317.2003.
- Drenkard E, Ausubel FM. *Pseudomonas* biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. *Nature* 2002;416: 740-3. doi: 10.1038/416740a.
- Rather MA, Gupta K, Mandal M. Microbial biofilm: formation, architecture, antibiotic resistance, and control strategies. *Braz J Microbiol* 2021; 52:1701-18. doi: 10.1007/s42770-021-00624-x.
- Carmeli Y, Troillet N, Eliopoulos GM, Samore MH. Emergence of antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: comparison of risks associated with different antipseudomonal agents. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43:1379-82. doi: 10.1128/AAC.43.6.1379.
- Driscoll JA, Brody SL, Kollef MH. The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs* 2007; 67:351-68. doi: 10.2165/00003495-200767030-00003.
- Schweizer HP. Efflux as a mechanism of resistance to antimicrobials in *Pseudomonas aeruginosa* and related bacteria: unanswered questions. *Genet Mol Res* 2003; 2:48-62.
- Begum S, Salam MA, Alam KF, Begum N, Hassan P, Haq JA. Detection of extended spectrum β -lactamase in *Pseudomonas* spp. isolated from two tertiary care hospitals in Bangladesh. *BMC Res Notes* 2013;6:7. doi: 10.1186/1756-0500-6-7.
- Salimi F, Eftekhari F. Prevalence of bla_{AbstractP} and bla_{VIM} gene carriage in metallo- β -lactamase-producing burn isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Tehran. *Turk J Med Sci* 2014;44:511-4. doi: 10.3906/sag-1302-67.
- PA W. Clinical and Laboratory Standards Institute: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 20th informational supplement. CLSI document M100-S20. 2010.
- Bahador N, Shoja S, Faridi F, Dozandeh-Mobarrez B, Qeshmi FI, Javadpour S, et al. Molecular detection of virulence factors and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* obtained from different clinical specimens in Bandar Abbas. *Iran J Microbiol* 2019; 11:25-30.
- Queipo-Ortuño MI, De Dios Colmenero J, Macias M, Bravo MJ, Morata P. Preparation of bacterial DNA template by boiling and effect of immunoglobulin G as an inhibitor in real-time PCR for serum samples from patients with brucellosis. *Clin Vaccine Immunol* 2008; 15:293-6. doi: 10.1128/CVI.00270-07.
- Kazemian H, Heidari H, Ghanavati R, Ghafourian S, Yazdani F, Sadeghifard N, et al. Phenotypic and genotypic characterization of ESBL-, AmpC-, and carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* isolates. *Med Princ Pract* 2019; 28:547-51. doi: 10.1159/000500311.
- Ratajczak M, Kamińska D, Nowak-Malczewska DM, Schneider A, Długaszewska 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; 28:306-13. doi: 10.26444/aaem/122682.
- Sader HS, Carvalhaes CG, Streit JM, Doyle TB, Castanheira M. Antimicrobial activity of ceftazidime-avibactam, ceftolozane-tazobactam and comparators tested against *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from United States Medical Centers in 2016-2018. *Microb Drug Resist* 2021; 27:342-49. doi: 10.1089/mdr.2020.0217.
- Fazeli H, Moslehi Z, Irajian G, Salehi M. Determination of Drug resistance patterns and detection of bla_{VIM} gene in *Pseudomonas aeruginosa* strains Isolated from burned patients in the Emam Mosa Kazem hospital, Esfahan, Iran (2008-9). *Iran J Med Microbiol* 2010; 3:1-8.
- Bhatt P, Rathi KR, Hazra S, Sharma A, Shete V. Prevalence of multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection in burn patients at a tertiary care centre. *Burns* 2015; 23:56-9.
- Senthamarai S, Sivasankari S, Anitha C, Somasunder V, Kumudhavathi M, Amshavathani S, et al. Resistance pattern of *Pseudomonas aeruginosa* in a tertiary care hospital of Kanchipuram, Tamilnadu, India. *Clin Diagn Res* 2014;8: DC30-2. doi: 10.7860/JCDR/2014/7953.4388.
- Mirsalehian A, Feizabadi M, Nakhjavani FA, Jabalameli F, Goli H, Kalantari N. Detection of VEB-1, OXA-10 and PER-1 genotypes in extended-spectrum β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burn patients. *Burns* 2010; 36:70-4. doi: 10.1016/j.burns.2009.01.015.

20. Imani Foolad A, Hosainzadeh M, Mousavi SF. Association between exotoxin A (exo-A) gene and antibiotic resistance pattern with biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Ardabil Univ Med Sci* 2011; 11:7-13.
21. da Silva Carvalho T, Perez LRR. Impact of biofilm production on polymyxin B susceptibility among *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2019; 40:739-40. doi: 10.1017/ice.2019.85.
22. Lima JLdC, Alves LR, Jacomé PRLdA, Bezerra Neto JP, Maciel MAV, Morais MMCd. Biofilm production by clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and structural changes in LasR protein of isolates non-biofilm-producing. *Braz J Infect Dis* 2018; 22:129-36. doi: 10.1016/j.bjid.2018.03.003.
23. Memar MY, Adibkia K, Farajnia S, Kafil HS, Khalili Y, Azargun R, et al. In-vitro effect of imipenem, fosfomycin, colistin, and gentamicin combination against carbapenem-resistant and biofilm-forming *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients. *Iran J Pharm Res* 2021; 20:286-96. doi: 10.22037/ijpr.2020.