Journal of Ilam University of Medical Sciences

P-ISSN: 1563-4728
E-ISSN: 2588-3135

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

A B S T R A C T

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.

© The Author(s)
Publisher: Ilam University of Medical Sciences

مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام
P-ISSN: ۱۵۶۳-۴۷۲۸
E-ISSN: ۲۵۸۸-۳۱۳۵

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

سمیه کرم اللهی [۱]، معین نیک روان [۱و۲]، پریسا اسداللهی [۱]، سبحان غفوریان [۲]، عباس ملکی [۲]، حمید حیدری [۳]، حسین کاظمیان [۱و۲*]

[۱] گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام، ایلام، ایران
[۲] مرکز تحقیقات میکروب شناسی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام، ایلام، ایران
[۳] گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران

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

نویسنده مسئول:
حسین کاظمیان
گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام، ایلام، ایران
Email:
h.kazemian@outlook.com

چکیده

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 تولیدکنندهٔ 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 مطالعهٔ 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 پلیمراز (PCR) شناسایی گردیدند. نتایج با استفاده از نرم‌افزار SPSS vol.2020 آنالیز شد.

یافته‌های پژوهش: ۴۰ جدایهٔ سودوموناس آئروژینوزا شناسایی گردید و همهٔ این جدایه‌ها تولیدکنندهٔ بیوفیلم بودند. مقاومت کاربابنم 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، سفتازیدیم، مروپنم، ایمیپنم و پیپراسیلین مشاهده گردید و ۱۶ جدایه به این آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم بودند. در بررسی نهایی جدایه‌های مولد کاربابنماز (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 کاربابنم، در میان جدایه‌های سودوموناس آئروژینوزا که عامل عفونت زخم‌های سوختگی هستند، قابل‌توجه بود. ترکیب مقاومت کاربابنم 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 اللهی 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): ۱۲۰-۱۰۹.

CC BY NC

حق‌مؤلف © نویسندگان

مقدمه

سودوموناس آئروژینوزا به‌عنوان یکی از شایع‌ترین عوامل بیماری‌زای انسانی در جنس سودوموناس شناخته می‌شود. این باکتری سومین عامل عفونت در بیمارستان‌ها، پس از استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیاکلای است (۱). عفونت‌های ناشی از سودوموناس آئروژینوزا به‌ویژه عفونت‌های زخم سوختگی، اهمیت بسیار بالایی دارد که سالانه سبب مرگ‌ومیر فراوانی می‌گردد. با وجود این، اطلاعات کافی دربارهٔ 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 ازجمله فقر مواد غذایی و فشار آنتی‌بیوتیکی قرار داشته باشند. تشکیل بیوفیلم به‌منظور 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 تودهٔ بیوفیلمی، جمعیت میکروبی تغییردهنده‌های الکترونی را اکسید می‌کند و باعث کاهش گیرنده‌های الکترونی می‌شود و پتانسیل احیا را کاهش می‌دهد. محققان عقیده دارند، هرچه لایهٔ بیوفیلمی ضخیم‌تر باشد، عمقی که یک گیرندهٔ الکترونی طی می‌کند، با گیرنده‌های دیگر تداخل پیدا می‌یابد (۴)؛ بنابراین، در یک محیط طبیعی، توده‌های میکروبیِ متنوع‌تر موفق‌تر عمل می‌کنند.

سودوموناس آئروژینوزا به رده‌ای منحصربه‌فرد از باکتری‌های گرم منفی تعلق دارد که به‌صورت ژنوتیپی به‌راحتی تغییر شکل میابد (۵). ظهور جهانی سویه‌های مقاوم به همهٔ آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام شامل کاربا‌پنم، نشان‌دهندهٔ توانایی بالای این ارگانیسم برای پاسخ سریع به تغییرات در مقابل فشارهای انتخابی محیط است. سازوکارهای مختلفی در ایجاد مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام شامل سازوکارهای آنزیمی و آنزیم‌های هیدرولیزکنندهٔ آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام (بتالاکتاماز) و سازوکارهای غیرآنزیمی 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 کاربا‌پنم در جدایه‌های سودوموناس آئروژینوزا جداشده از عفونت‌های زخم سوختگی، به‌منظور 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 بازهٔ 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. درمجموع، ۱۱۳ نمونهٔ بالینی از عفونت زخم سوختگی بیماران مراجعه‌کننده به بیمارستان‌های سوانح سوختگی تهران و اهواز جمع‌آوری گردید. نمونه‌ها پس از انتقال به آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی ایلام، برای تشخیص فنوتیپی روی محیط‌های مککانکی آگار و بلاد آگار حاوی ۵ درصد خون گوسفندی کشت داده و در ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد، به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. شناسایی اولیهٔ جدایه‌ها به روش فنوتیپی و بر اساس ویژگی بیوشیمیایی و بر مبنای دستورالعمل‌های استاندارد صورت گرفت. در این مطالعه، اطلاعات جمع‌آوری‌شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS vol.2020 تجزیه‌وتحلیل گردید.

آزمون حساسیت آنتی‌بیوتیکی: در این مطالعه، ارزیابی حساسیت ضدمیکروبی جدایه‌ها با استفاده از روش استاندارد دیسک دیفیوژن بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار (Merk، آلمان)، با استفاده از دیسک‌های سفوتاکسیم (۳۰ میکروگرم)، سفتازیدیم (۳۰ میکروگرم)، پیپراسیلین (۳۰ میکروگرم)، ایمی‌پنم (۱۰ میکروگرم)، مروپنم (۱۰ میکروگرم) تهیه‌شده از شرکت (پادتن طب) صورت گرفت. برای انجام این کار، پس از ایزوله کردن باکتری، مقداری از کلونی باکتری به‌وسیلهٔ انس برداشته و در سرم فیزیولوژی استریل حل شد و پس از تهیهٔ سوسپانسیون میکروبی معادل غلظت نیم مکفارلند، به‌وسیلهٔ سواپ روی محیط کشت مولر هینتون آگار به‌صورت چمنی کشت گردید و پس از انکوبه در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد، قطر هاله‌های عدم رشدیافته توسط خطکش اندازه‌گیری شد. از ATCC25922 Escherichia coli به‌عنوان کنترل کیفی برای ارزیابی صحت قطر هالهٔ عدم رشد آنتی‌بیوتیک، طبق دستورالعمل CLSI 2020 استفاده گردید.

شناسایی فنوتیپی تولید بتالاکتاماز (ESBL)، متالوبتالاکتاماز (MBL) و کارباپنماز؛ بتالاکتاماز: آزمون فنوتیپی برای شناسایی آنزیم‌های بتالاکتاماز با استفاده از دیسک سفتازیدیم (۳۰ میکروگرم) به‌تنهایی و دیسک حاوی سفتازیدیم و کلاوولانیک اسید (۱۰/۳۰ میکروگرم) روی محیط مولر هینتون آگار مطابق استانداردهای CLSI 2020 انجام شد. پس از ۲۴–۱۸ ساعت، اگر قطر هالهٔ عدم رشد در اطراف دیسک حاوی سفتازیدیم و کلاوولانات حداقل ۵ میلی‌متر و بیشتر از دیسک حاوی سفتازیدیم به‌تنهایی بود، آزمایش مثبت در نظر گرفته شد (۸).

متالوبتالاکتاماز: در این روش، از باکتری‌هایی که نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های کارباپنم مقاوم و یا نیمه‌حساس بودند، سوسپانسیون نیم مکفارلند تهیه گردید؛ سپس روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده شد. برای شناسایی متالوبتالاکتامازها از دیسک ایمی‌پنم (۱۰ میکروگرم) به‌تنهایی و در مجاورت یک دیسک حاوی EDTA (ایمی‌پنمEDTA–) استفاده گردید؛ سپس پلیت‌ها به مدت ۲۴–۱۸ ساعت، در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شدند. افزایش ۹ میلی‌متری قطر هالهٔ عدم رشد در اطراف دیسک (ایمی‌پنمEDTA–) نشان‌دهندهٔ حضور متالوبتالاکتاماز بود (۹).

کارباپنماز: جدایه‌های سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های کارباپنم از نظر حضور کارباپنمازها بررسی گردید. بر اساس CLSI 2020، درصورتی‌که قطر هالهٔ عدم رشد اطراف دیسک مروپنم (۱۰ میکروگرم) بین ۶ الی ۱۵ میلی‌متر باشد، به‌عنوان کارباپنماز مثبت در نظر گرفته می‌شود و اگر قطر هالهٔ عدم رشد اطراف دیسک مروپنم بزرگ‌تر یا مساوی ۱۹ میلی‌متر باشد، به‌عنوان کارباپنماز منفی در نظر گرفته می‌شود (۱۰).

آزمون بیوفیلم با روش میکروتیتر پلیت: در این مطالعه، از روش فنوتیپی میکروتیتر پلیت برای تعیین قدرت تشکیل بیوفیلم در باکتری سودوموناس آئروژینوزا استفاده گردید. در این روش، جدایه باکتری جمع‌آوری‌شده به مدت یک شبانه‌روز در دمای ۳۷ درجه انکوبه شدند؛ سپس تککلونی‌ها از هر جدایهٔ سودوموناس آئروژینوزا به محیط TSB (Tryptic Soy Broth) با ۲ درصد گلوکز منتقل گردیدند و در ادامه، سوسپانسیون میکروبی آماده در طول‌موج تعیین‌شده به میکروپلیتهای ۹۶ خانه‌ای منتقل شد، به این صورت که در داخل هر چاهک، ۱۸۰ میکرولیتر از محیط TSB ریخته و به آن ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی

اضافه و برای مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد انکوبه شد. محتوای چاهک‌ها به‌آرامی 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 جدارهٔ چاهک، در دمای اتاق قرار داده شدند. در مرحلهٔ 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 به‌منظور حذف رنگ اضافه، پلیت به‌آرامی با آب مقطر سه بار شستشو داده شد و درنهایت، ۲۰۰ میکرولیتر اسید استیک گلاسیال ۳۳ درصد به هرکدام 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 الایزا ریدر اندازه‌گیری گردید (۱۱).

نمونهٔ 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.

واکنش زنجیره پلیمراز (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 مرحلهٔ پایانی، ۱۰۰ میکرولیتر از مایع رویی برداشته شد و به یک میکروتیوب ۰/۲ منتقل گردید. این مایع تا زمان آزمایش PCR در ۲۰- درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری شد. DNA استخراج‌شده از نظر کمی و کیفی، با استفاده از دو روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز روی ژل آگارز بررسی گردید.

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

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

Gene	Sequence(۵'->۳')	Amplicon Siza (bp)	Tm	refrence
bla_{SHV}	F:GCCCGGGTTATTCTTATTTGTCGC R:TCTTTCCGATGCCGCCGCCAGTCA	۱۰۱۳bp	۵۵	(۱۳)
bla_{TEM}	F:TCCGCTCATGAGACAATAACC R: ATAATACCGCACCACATAGCAG	۳۰۰bp	۵۵	(۱۳)
bla_{CTX-M}	F: TTTGCGATGTGCAGTACCAGTAA R: CGATATCGTTGGTGGTGCCATA	۴۵۵bp	۵۶	(۱۳)
bla_{VIM}	F: GATGGTGTTTGGTCGCATA R: CGAATGCGCAGCACCAG	۳۹۰bp	۵۴	(۱۳)
bla_{IMP}	F: AGCCCATAGTTAACCCCGCC R:CTGGCTTAATTCTCAATCCATCCC	۱۱۴bp	۵۳	(۱۳)
bla_{NDM}	F: GGTTTGGCGATCTGGTTTTC R: CGGAATGGCTCATCACGATC	۶۲۱bp	۵۶	(۱۳)
bla_{oxa-23}	F: TGGAAGGGCGAGAAAAGGTC R: TTGCCCAACCAGTCTTTCCA	۴۰۰bp	۵۵	(۱۳)
bla_{oxa-48}	F: GCGTGGTTAAGGATGAACAC R: CATCAAGTTCAACCCAACCG	۴۳۸bp	۵۵	(۱۳)
bla_{oxa-11}	F: CGAGTACGGCATTAGCTGGT R: CTCTTGGCTTTCCGTCCCAT	۲۵۰bp	۵۶	(۱۳)

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

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

Gene	Initial Denaturation	Denaturation	Annealing	Extension	Cycle	Final Extension
bla_{SHV}	۹۵ °C- ۵ min	۹۵°C- ۴۵s	۵۵°C- ۴۵s	۷۲°C- ۱min	۳۰	۷۲°C-۱۰min
bla_{TEM}	۹۵ °C- 5 min	۹۵°C- ۴۵s	۵۵°C- ۴۵s	۷۲°C- ۱min	۳۰	۷۲°C-۱۰min
$bla_{CTX\text{-}M}$	۹۵ °C- ۵ min	۹۵°C- ۴۵s	۵۶°C- ۴۵s	۷۲°C- ۱min	۳۰	۷۲°C-۱۰min
bla_{VIM}	۹۴ °C- ۱۰ min	۹۴°C- ۳۰s	۵۴°C- ۳۵s	۷۲°C- ۳۰s	۳۶	۷۲°C-۵min
bla_{IMP}	۹۵°C- ۱ min	۹۵°C- ۳۵s	۵۳°C- ۳۰s	۷۲°C- ۲۵s	۳۱	۷۲°C-۷min
bla_{NDM}	۹۵°C- ۵ min	۹۵°C- ۳۵s	۵۶°C- ۵۰s	۷۲°C- ۴۵s	۳۵	۷۲°C-۶min
$bla_{oxa\text{-}23}$	۹۵°C- ۵ min	۹۵°C-۴۵s	۵۵°C- ۴۵s	۷۲°C- ۱min	۳۰	۷۲°C-۱۰min
$bla_{oxa\text{-}48}$	۹۵°C- ۵ min	۹۵°C-۴۵s	۵۵°C- ۴۵s	۷۲°C- ۱min	۳۰	۷۲°C-۱۰min
$bla_{oxa\text{-}11}$	۹۵°C- ۵ min	۹۵°C-٤٥s	۵۶°C- ۴۵s	۷۲°C- ۱min	۳۰	۷۲°C-۱۰min

یافته‌های پژوهش

از میان ۱۱۳ نمونه سوختگی جمع‌آوری‌شده در طول بازهٔ زمانی ۶ ماه، ۴۰ جدایه (۳۰ درصد) سودوموناس آئروژینوزا شناسایی شد. همهٔ جدایه‌ها از نظر آزمون‌های تشخیصی بیوشیمیایی، الگوی یکسانی داشتند. نتایج آزمون آنتیبیوگرام به روش دیسک دیفیوژن در مورد نمونه‌ها نشان داد، بیشترین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی به سفالوسپوینهای نسل ۳ و کاربا‌پنمها ۴۰ درصد بود (جدول شمارهٔ ۳).

جدول شماره ۳. نتایج تعیین حساسیت ضدمیکروبی به روش دیسک دیفیوژن

نام آنتی‌بیوتیک	حساس	مقاوم
سفتازیدیم	۲۴ (۶۰ درصد)	۱۶ (۴۰ درصد)
سفوتاکسیم	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)

نتایج آزمون‌های تأییدی فنوتیپی به روش دیسک ترکیبی به‌منظور بررسی حضور آنزیم‌های ESBL متالوبتالاکتاماز و کاربا‌پنماز: از میان ۱۶ جدایهٔ مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های سفالوسپورینهای نسل ۳، همهٔ جدایه‌ها بدون آنزیم‌های ESBL بودند و از میان ۱۶ جدایهٔ مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های کاربا‌پنم، ۱۲ جدایه (۳۰ درصد) از نظر آزمون تأییدی فنوتیپی به روش دیسک ترکیبی، مولد آنزیم‌های متالوبتالاکتاماز و ۱۶ جدایه (۴۰ درصد) مولد آنزیم‌های کاربا‌پنماز بودند.

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

به‌ترتیب در ۶ جدایه (۱۵ درصد)، ۸ جدایه (۲۰ درصد) و ۱۵ جدایه (۳۷/۵ درصد) شناسایی گردیدند. در مورد متالوبتالاکتاماز (کلاس B، 12 جدایه (۳۰ درصد) از ۴۰ جدایه bla_{VIM} داشتند. از سوی دیگر، bla_{NDM} و bla_{IMP} در هیچ‌یک از جدایه‌ها شناسایی نشد. در مورد کاربا‌پنماز (کلاس D)، 7 جدایه (۱۷/۵ درصد) از ۴۰ جدایه حاوی ژن bla_{OXA-48} بودند. بااین‌حال، bla_{OXA-11} در میان جدایه‌ها شناسایی نشد. جزئیات در جدول شمارهٔ ۴ نشان داده‌شده و الگوی توزیع ژن‌ها در سراسر جدایه‌ها در جدول شمارهٔ ۵ فهرست گردیده است.

جدول شماره ٤. توزیع ژن‌های مقاومت ESBL، MBL و کاربا‌پنم در میان ۴۰ جدایهٔ سودوموناس آئروژینوزا

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

جدول شماره ۵. توزیع ژن‌های مختلف در سراسر جدایه‌ها

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

نتایج بررسی تشکیل بیوفیلم ایزوله‌های جمع‌آوری‌شدهٔ سودوموناس آئروژینوزا: در بررسی نهایی جدایه‌های مولد بیوفیلم در باکتری سودوموناس آئروژینوزا مطالعه‌شده به روش فنوتیپی، ۴۰ جدایه از نظر تشکیل بیوفیلم بررسی گردید و نتایج در طول‌موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه الایزا ریدر خوانش شد. پس از خوانش جذب نوری (OD) نتایج به روش CUT OFF به تفکیک مشخص گردید. برای تجزیه‌وتحلیل کمی تولید بیوفیلم، میانگین جذب نوری سه چاهک بیوفیلم به‌عنوان (A) با چاهک کنترل به‌عنوان (AC) مقایسه شد و به‌صورت زیر محاسبه گردید:

تشکیل نشدن بیوفیلم: $A \leq AC$

نمونه‌های با بیوفیلم ضعیف: $AC < A \leq (2\times AC)$

نمونه‌های با بیوفیلم متوسط: $(2\times AC) < A \leq (4\times AC)$

نمونه‌های با بیوفیلم قوی: $A > (4\times AC)$

۱۶ جدایه (۴۰ درصد) از جدایه‌ها توانایی اتصال قوی داشتند و هیچ‌کدام از جدایه‌ها بدون تشکیل بیوفیلم نبودند (جدول شمارهٔ ۶)؛ همچنین مقایسهٔ حضور ژن‌های کاربا‌پنماز در میان جدایه‌های سودوموناس آئروژینوزا تولیدکنندهٔ بیوفیلم قوی نشان داد که از نظر آماری میان وجود ژن‌های کاربا‌پنماز و تشکیل بیوفیلم ارتباط معنی‌داری وجود دارد ($P<0.05$) (جدول شمارهٔ ۷).

جدول شماره ٦. بررسی میزان تولید بیوفیلم به روش میکروتیتر پلیت در جدایه‌های سودوموناس آئروژینوزا جداشده از عفونت زخم سوختگی

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

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

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

	Number of isolates	Resistance	Beta-lactamases Classes
Biofilm high	۲	bla_{TEM}, bla_{SHV}, bla_{CTX-M} + bla_{VIM}	A+B
	۱	bla_{SHV} + bla_{TEM}	A
	۱	bla_{TEM}, bla_{SHV}, bla_{CTX-M} + bla_{oxa-23}	A+B +D
	۱	bla_{TEM}, bla_{SHV}, bla_{CTX-M} + bla_{VIM} + bla_{oxa-48}	A+B +D
	۱	bla_{TEM} + bla_{VIM} + bla_{oxa-48}	A+B+D
	۱	bla_{TEM} + bla_{CTX-M} + bla_{oxa-48}	A+ D
	۱	bla_{TEM}, bla_{CTX-M} + bla_{VIM}	A+B
	۱	bla_{TEM}, bla_{CTX-M} + bla_{VIM} + bla_{oxa-48}	A+B +D
	۱	bla_{TEM} + bla_{oxa-48}	A+D
	۱	bla_{VIM} + bla_{oxa-48}	B+D

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 مطالعهٔ حاضر، باکتری سودوموناس آئروژینوزا از زخم سوختگی بیماران بستری در بیمارستان شنایی شدند و میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی و تولید بیوفیلم آن‌ها ارزیابی گردید. مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های کاربا‌پنم مانند ایمی‌پنم و مروپنم ۴۰ درصد (۱۶ جدایه) بود، درحالی‌که این میزان در یک مطالعهٔ انجام‌شده در لهستان به‌ترتیب ۴۱ درصد و ۶۱/۶ درصد بود (۱۴)؛ همچنین در مطالعات پیشین که در ایالات‌متحده انجام‌شده بود، مقاومت مروپنم (۷/ ۲۳ درصد) در بین جدایه‌های سودوموناس آئروژینوزا گزارش گردید (۱۵). در مطالعات انجام‌شده در ایران ازجمله مطالعه‌ای در شهرکرد و اصفهان، میزان مقاومت به ایمی‌پنم را به‌ترتیب ۵۸ درصد و ۹۴ درصد گزارش شد که این میزان نشان‌دهندهٔ مقاومت بالاتری نسبت به کاربا‌پنم در جدایه‌های سودوموناس آئروژینوزا جداشده از زخم‌های سوختگی است (۱۶). از عللی که می‌تواند سبب ایجاد این تفاوت‌ها در میزان مقاومت نسبت به سایر مطالعات ذکرشده شود، می‌توان منشأ عفونت در بیماران بستری را بیان کرد. با توجه به اینکه باکتری جداشده در مطالعهٔ ما، جدایه‌های بیمارستانی شناسایی‌شده 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 شناسایی‌شده از

زخم‌های سوختگی، مقاوم به ایمی‌پنم بودند (۱۷). درمجموع، به‌نظر می‌رسد که شیوع مقاومت به کاربانم، به منطقهٔ جغرافیایی موردمطالعه بستگی دارد.

آنزیم‌های MBL و کاربانماز به‌عنوان اصلی‌ترین عامل مقاومت در برابر کاربانم در نظر گرفته می‌شوند. در مطالعهٔ حاضر، ۱۲ جدایه (۳۰ درصد) از همهٔ جدایه‌ها، برای کدگذاری حداقل یکی از آنزیم‌های MBL و ۱۶ جدایه (۴۰ درصد) کاربانماز مثبت بودند و وجود همزمان ژن‌های ESBL، MBL و کاربانماز 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 $bla_{\text{CTX-M}}$ شایع‌ترین ژن‌های بتالاکتاماز در میان جدایه‌ها بودند. در مطالعهٔ پیمانی و همکاران، $bla_{\text{TEM-1}}$ (۲۶/۷ درصد) و $bla_{\text{CTX-M}}$ (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 (۱۹، ۸).

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

مطالعات انجام‌شده ازجمله مطالعهٔ لیما و همکاران و مطالعه‌ای که در تبریز انجام شد، نشان داد که میزان تولید بیوفیلم در جدایه‌های سودوموناس آئروژینوزا به‌ترتیب ۷۷/۵ درصد و ۶۳ درصد بود که از یافتهٔ ما حمایت می‌کند (۲۲، ۲۱). در مقایسهٔ میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی و تشکیل بیوفیلم در سودوموناس آئروژینوزا و سایر پاتوژن‌های باکتریایی ارتباط مستقیمی وجود دارد و مطالعات متعدد نشان داده است که احتمال تشکیل بیوفیلم در سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به چند دارو بیشتر است. ازآنجاکه در این سویه‌ها احتمال انتقال افقی ژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک بیشتر اتفاق می‌افتد؛ بنابراین، این باکتری‌ها بیوفیلم‌های قوی‌تری را تشکیل می‌دهند. علاوه بر این، ایزوله‌های تشکیل‌دهندهٔ بیوفیلم مقادیر حداقل غلظت مهاری (MIC) متفاوتی نسبت به سلول‌های پلانکتون دارند. از این جهت لازم است که ترکیبی از آنتی‌بیوتیک‌ها برای حذف سویه‌های تشکیل‌دهندهٔ بیوفیلم استفاده شود (۲۳). از نتایج مهم این مطالعه پتانسیل بالای تولید بیوفیلم در جدایه‌های مقاوم به درمان است و نشان داده شد که میزان تولید بیوفیلم با مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام ارتباط مستقیمی دارد. از سویی، می‌توان به تعداد نمونه‌های استفاده‌شده 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 قابل‌توجه است؛ همچنین ازآنجاکه تولید بیوفیلم عامل مؤثری در افزایش میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بین جدایه‌ها است؛ بنابراین، درمان جایگزین برای حذف بیوفیلم می‌تواند به کاهش میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی در عفونت‌های سوختگی تهدیدکنندهٔ 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 بیوفیلم باکتریایی نیز بود.

سپاس‌گزاری

از جناب آقای دکتر بهروز صادقی کلانی که در امر

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

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌نمایند که تعارض منافعی وجود ندارد.

کد اخلاق

IR.MEDILAM.REC.1399.237

سهم 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

1. 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.
2. 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.
3. Drenkard E, Ausubel FM. Pseudomonas biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. Nature 2002;416: 740-3. doi: 10.1038/416740a.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 7. 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.
8. 8. 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.
9. Salimi F, Eftekhar F. Prevalence of blAbstractP and blaVIM gene carriage in metallo-\beta-lactamase-producing burn isolates of Pseudomonas aeruginosa in Tehran.Turk J Med Sci 2014;44:511-4. doi: 10.3906/sag-1302-67.
10. PA W. Clinical and Laboratory Standards Institute: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 20th informational supplement. CLSI document M100-S20. 2010.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. Ratajczak M, Kamińska D, Nowak-Malczewska DM, Schneider A, Dlugaszewska 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.
15. 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.
16. Fazeli H, Moslehi Z, Irajian G, Salehi M. Determination of Drug resistance patterns and detection of bla-VIM gene in Pseudomonas aeruginosastrains Isolated from burned patients in the Emam Mosa Kazem hospital, Esfahan, Iran (2008-9). Iran J Med Microbiol 2010; 3:1-8.
17. 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.
18. 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.
19. 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.