

STUDY ON THE MODEL OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* BIOFILM FORMATION AND ITS APPLICATION TO EVALUATE INHIBITORY ANTIBIOFILM OF ANTIBIOTIC

Vo Thi Hai Duong*, Nguyen Minh Thai

University of Medicine and Pharmacy at Ho Chi Minh city

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received: 20/6/2023	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Pa) have been one of the leading causes of hospital infection, and it is especially true with the Pa having capability to form biofilms. This is due to the fact that biofilm could impede the permeability of antibiotics into bacteria by various mechanisms, which lead to antibiotic resistance as well as treatment failure. This research aims to investigate conditions related to biofilm formations before applying this to examine impacts of antibiotics on biofilm formation. This study was performed on a 96-well plate (96-Microtiter Well Plate) in order to evaluate the biofilm-forming ability of Pa ATCC 9027, ATCC 27853 and PA02. The study inspected biofilm development on the following conditions including: culture medium (M9, M63, N-minimal, MHB), coupons and temperatures. The optimal conditions for biofilm formations were fruitfully investigated, which contained MHB medium, a temperature at 37°C and inserting coupons (multi-factor Anova test with $p < 0.010$). To determine the correlation between resistance and biofilm developments, the strain ATCC 27853 was continuously cultured in MHB medium containing 0.5x MIC (32 µg/ml). After more than 300 generations, the value OD and a resistant strain was created with the MIC of ciprofloxacin that have relate, whose regression test was with $R^2 = 0.654$ and $p < 0.010$. When there were appropriate conditions, carrying out researchs about the synergistic effect of two antibiotics namely colistin and rifampicin with the checkerboard experiment. Outcomes of FIC was $0.75 \leq 1$ while PA02 and ATCC 9027 inserting coupon had FIC=0.625.
Revised: 17/7/2023	
Published: 17/7/2023	
KEYWORDS	
Biofilm	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
96-well microtiter plates (96-MWP)	
MIC	
FIC	

NGHIÊN CỨU MÔ HÌNH TẠO MÀNG SINH HỌC (BIOFILM) CỦA *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* VÀ ỨNG DỤNG ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH KHÁNG BIOFILM CỦA KHÁNG SINH

Võ Thị Hải Đường*, Nguyễn Minh Thái

Trường Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 20/6/2023	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Pa) là tác nhân hàng đầu gây nhiễm trùng bệnh viện, có khả năng hình thành màng sinh học (biofilm). Biofilm giúp cho vi khuẩn tăng khả năng chống chịu và giảm tính thấm kháng sinh dẫn đến điều trị thất bại. Vì vậy, mục tiêu của nghiên cứu này là khảo sát các điều kiện liên quan đến sự hình thành biofilm và ứng dụng khảo sát các kháng sinh tác động lên quá trình hình thành biofilm của vi khuẩn. Nghiên cứu được thực hiện trên phiên 96 giếng để đánh giá khả năng hình thành biofilm của các chủng Pa ATCC 9027, ATCC 27853 và PA02 với các điều kiện về: môi trường (M9, M63, N-minimal, MHB), giá mang, nhiệt độ. Kết quả đã khảo sát được điều kiện tối ưu: môi trường MHB, nhiệt độ 37°C và sử dụng giá mang (phép kiểm Anova nhiều yếu tố với $p < 0,010$). Để xác định mối liên hệ giữa sự đề kháng và sự hình thành biofilm thử nghiệm tiền hoá được thực hiện trên chủng ATCC 27853 cấy chuyển liên tục trong môi trường MHB chứa 0,5xMIC (32µg/ml) của ciprofloxacin. Sau hơn 300 thế hệ, xác định mối liên hệ giữa giá trị OD của biofilm và MIC ciprofloxacin (phép kiểm regression với $R^2 = 0,654$; $p < 0,010$). Thử nghiệm bàn cờ được thực hiện nhằm đánh giá tác động của colistin và rifampicin lên quá trình hình thành biofilm với kết quả FIC= 0,75 ≤ 1, riêng PA02 và ATCC 9027 có giá mang là FIC= 0,625 ≤ 1.
Ngày hoàn thiện: 17/7/2023	
Ngày đăng: 17/7/2023	
TỪ KHÓA	
Màng sinh học	
Trực khuẩn mũ xanh	
Phiên 96 giếng	
MIC	
FIC	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.8181>

* Corresponding author. Email: vthduong.chdlvds21@ump.edu.vn

1. Giới thiệu

Trực khuẩn mủ xanh hay còn gọi là *Pseudomonas aeruginosa* (*Pa*), thuộc nhóm vi khuẩn gram âm hiếu khí, hình que đứng riêng lẻ, thành đôi hoặc có khi xếp thành chuỗi và có khả năng di động bằng một hoặc nhiều lông ở một đầu. Phần lớn nhiễm trùng *Pa* xảy ra ở những bệnh nhân nhập viện, đặc biệt là những người giảm bạch cầu trung tính hoặc những người suy giảm miễn dịch [1]-[3]. Ngoài ra, *Pa* có khả năng hình thành màng sinh học (biofilm), làm tăng khả năng đề kháng kháng sinh của vi khuẩn [2], [4], [5]. Vì vậy, việc nghiên cứu tác dụng kháng biofilm của các thuốc kháng sinh hiện có đối với chủng vi khuẩn *Pa* đang trở nên cấp thiết. Hiện nay, xây dựng mô hình biofilm trong điều kiện nuôi cấy tĩnh với phiên 96 giếng được sử dụng nhiều trong nghiên cứu và phát triển thuốc [6]. Phương pháp này được xây dựng theo hướng đơn giản hóa, không những rút ngắn được thời gian sàng lọc những chất tiềm năng mà còn sơ bộ đánh giá được hiệu quả kháng biofilm một cách định lượng [7], [8]. Vì vậy, nghiên cứu nhằm: (i) khảo sát các điều kiện nuôi cấy hình thành biofilm của *Pa*, (ii) khảo sát mối liên hệ giữa sự đề kháng và sự hình thành biofilm, (iii) bước đầu khảo sát các kháng sinh có khả năng ức chế sự hình thành biofilm trên phiên 96 giếng.

2. Vật liệu và phương pháp

2.1. Vật liệu

Chủng *Pa* ATCC 9027, ATCC 27853, PA02 lưu giữ tại Bộ Môn Vi sinh - Ký sinh, Khoa Dược – Đại học Y Dược thành phố Hồ Chí Minh. Môi trường nuôi cấy: môi trường dinh dưỡng (Mueller Hinton Broth/Agar, MHB/MHA), môi trường tối thiểu (M9, M63, N-minimal) của Merck, Đức. Kháng sinh thử nghiệm: ciprofloxacin, rifampicin, colistin của Merck, Đức.

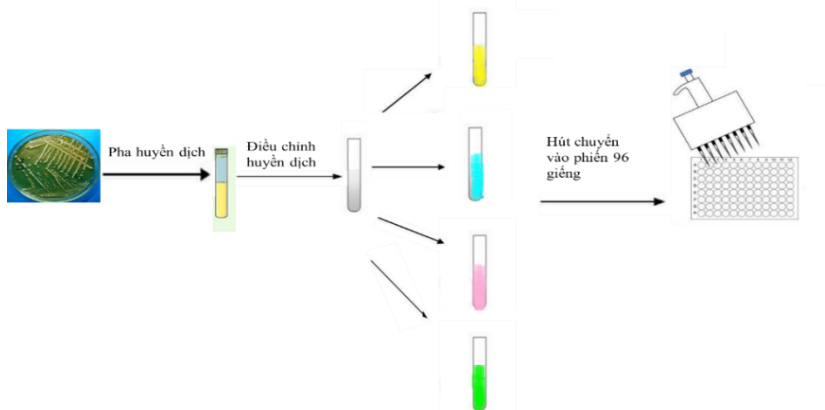
2.2. Phương pháp

Hoạt hoá vi khuẩn

Chủng vi khuẩn được cấy phân lập trên môi trường MHA. Trên mặt thạch chọn ít nhất từ ba đến năm khuẩn lạc rồi cấy chuyển vào 5 ml môi trường MHB, ủ ở 37°C trong 2 đến 6 giờ. Sau đó, điều chỉnh huyền dịch vi khuẩn bằng cách đo độ hấp thụ ánh sáng ở bước sóng 595 nm đạt 0,1 với dung dịch MHB.

2.2.1. Khảo sát các điều kiện hình thành biofilm

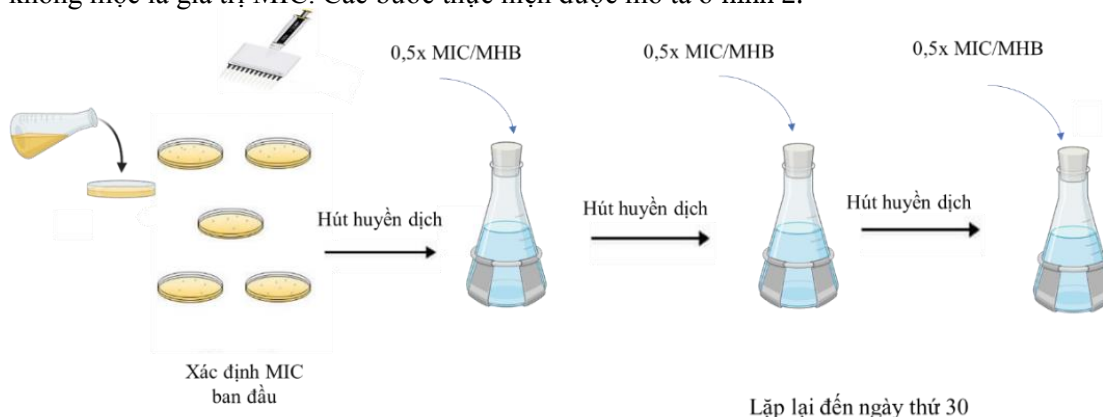
Pha loãng huyền dịch với môi trường cần nghiên cứu theo tỉ lệ 1:100 (để đạt mật độ tương đương $1-2 \times 10^6$ CFU/ml). Hút 100µl huyền dịch vào phiên 96 giếng, chèn giá mang để tăng khả năng tạo thành biofilm cũng như dễ dàng lấy ra quan sát và sử dụng cho các thử nghiệm tiếp theo. Ủ phiên 96 giếng trong tủ ấm 37°C trong 18 đến 24 giờ, nhuộm tím tinh thể để xác định sự hình thành biofilm [7]. Các bước thực hiện được mô tả ở hình 1.



Hình 1. Phương pháp khảo sát các điều kiện hình thành biofilm

2.2.2 Khảo sát mối liên hệ giữa sự đề kháng và sự hình thành biofilm

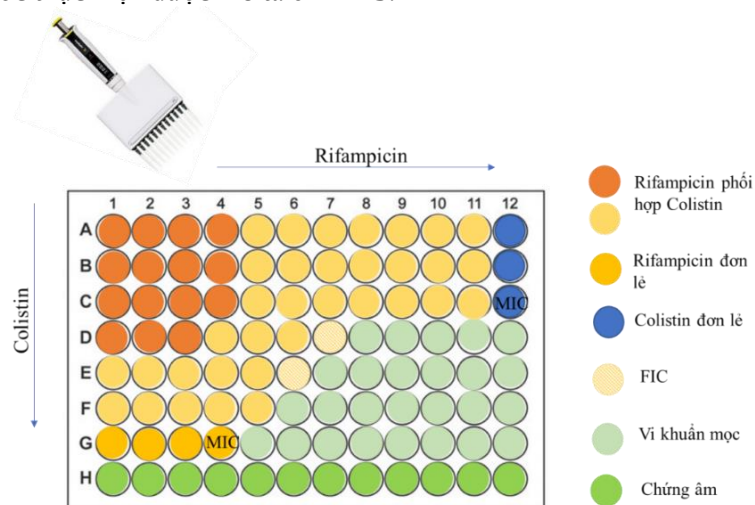
Thử nghiệm tiền hóa được thực hiện khi cho chủng tiếp xúc với ciprofloxacin với nồng độ dưới MIC trong 18-24 giờ và được cấy chuyển liên tục trong 30 ngày (khoảng 300 thế hệ) [9]. Để cấy chuyển liên tục, hút đồng thể tích vi khuẩn và môi trường MHB chứa $0,5 \times \text{MIC}$ ciprofloxacin cho vào bình nón, sau đó lắc trong 18-24 giờ. Sau 24 giờ, lưu chủng trong glycerol nồng độ 25% (tt/tt), ở -20°C lặp lại như vậy đến ngày thứ 30. Sau đó xác định MIC và OD sau ngày thứ 30 [10]. Sử dụng phương pháp pha loãng kháng sinh trong thạch để xác định MIC của chủng ban đầu và các chủng thu được qua tiền hóa [3]. Vi khuẩn được hoạt hoá theo quy trình đã nêu, tiếp theo chấm 1µl huyền dịch (chứa khoảng 10^4 CFU/ml) lên đĩa thạch chứa kháng sinh theo dãy nồng độ từ 0,5-256 ($\mu\text{g/ml}$). Nồng độ kháng sinh trên đĩa thấp nhất quan sát vi khuẩn không mọc là giá trị MIC. Các bước thực hiện được mô tả ở hình 2.



Hình 2. Phương pháp khảo sát mối liên hệ giữa sự đề kháng và sự hình thành biofilm

2.2.3. Khảo sát ức chế hình thành biofilm của colistin và rifampicin

Vi khuẩn được hoạt hoá như trên và mật độ vi khuẩn trong mỗi giếng khoảng $1 - 2 \times 10^6$ CFU/ml. Kháng sinh được pha theo nồng độ xung quanh giá trị MIC colistin ($1 - 2 \mu\text{g/ml}$) và rifampicin ($20 - 40 \mu\text{g/ml}$) để bố trí thí nghiệm bàn cờ [11], [12]. Trên phiên 96, vị trí giếng A1 nồng độ colistin $8 \mu\text{g/ml}$ và nồng độ rifampicin $320 \mu\text{g/ml}$. Nồng độ kháng sinh ở các chiều ngang cố định colistin và giảm $\frac{1}{2}$ nồng độ rifampicin giếng bên cạnh và ngược lại với các giếng chiều dọc. Các bước thực hiện được mô tả ở hình 3.



Hình 3. Phương pháp khảo sát ức chế hình thành biofilm của colistin và rifampicin

2.2.4. Phương pháp định lượng biofilm bằng Crystal Violet (tím tinh thể)

Sau khi ủ, hút bỏ toàn bộ dịch nuôi cấy trong phiên 96 giếng ra ngoài. Thêm $125\mu\text{L}$ tím tinh thể nồng độ 0,1% (kl/tt) vào mỗi giếng. Ủ phiên 96 giếng ở nhiệt độ phòng trong 10-15 phút. Tráng phiên 96 giếng bằng nước 3-4 lần, lắc mạnh và thấm trên một xấp giấy, có thể gõ nhẹ lên bàn để loại bỏ hoàn toàn các mảnh tế bào thừa và thuốc nhuộm. Lật ngược phiên 96 giếng và để khô trong 6-8 giờ hoặc qua đêm. Sau đó thêm $150\mu\text{L}$ acid acetic 30% (tt/tt) vào giếng để hòa tan tím tinh thể trong 10-15 phút. Chuyển $125\mu\text{L}$ phần tím tinh thể đã hòa tan qua phiên 96 giếng mới. Định lượng bằng đo quang ở bước sóng 595 nm với acid acetic 30% (tt/tt) làm mẫu chuẩn. Giá trị thu được tỉ lệ thuận với sự tạo thành biofilm, có nghĩa là giá trị càng cao thì biofilm được hình thành càng nhiều.

Độ lặp lại: Nghiên cứu tiến hành đánh giá độ lặp lại bằng cách thực hiện thí nghiệm 2 lần độc lập với 2 lần chuẩn bị hóa chất thí nghiệm khác nhau.

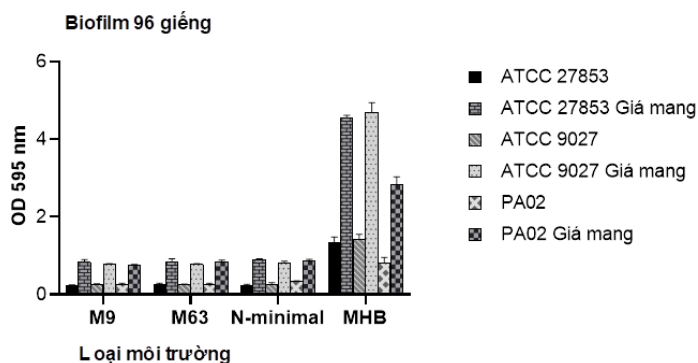
Phần mềm thống kê: Phần mềm thống kê được sử dụng là GrahPad Prism version 8.0.1.244.

3. Kết quả và bàn luận

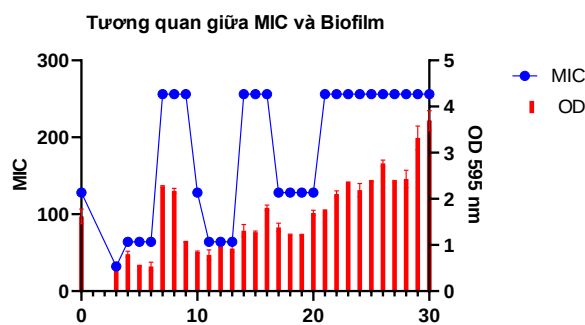
3.1. Kết quả

3.1.1. Khảo sát mối liên hệ giữa môi trường nuôi cấy, giá mang và sự hình thành biofilm

Thử nghiệm cho thấy môi trường nuôi cấy có liên quan đến khả năng hình thành biofilm, kết quả được trình bày ở hình 4. Môi trường M9, M63, N-minimal là môi trường tối thiểu cho *Pa*. Môi trường MHB là môi trường giàu dinh dưỡng nên khả năng hình thành biofilm nhiều hơn các môi trường còn lại. Môi trường nuôi cấy khác nhau có liên quan đến khả năng hình thành biofilm (với mức $p < 0,010$), có ý nghĩa thống kê [7]. Các chủng *Pa* khác nhau cho thấy sự tạo thành biofilm khác nhau (với mức $p < 0,010$), có ý nghĩa thống kê. Sự hình thành biofilm cho thấy, khi có giá mang đính kèm vào 96 giếng thì khả năng hình thành biofilm cao gấp 2-4 lần so với không đính kèm giá mang. Kết quả này có sự khác biệt rõ rệt (với mức $p < 0,010$) và có ý nghĩa thống kê [8].



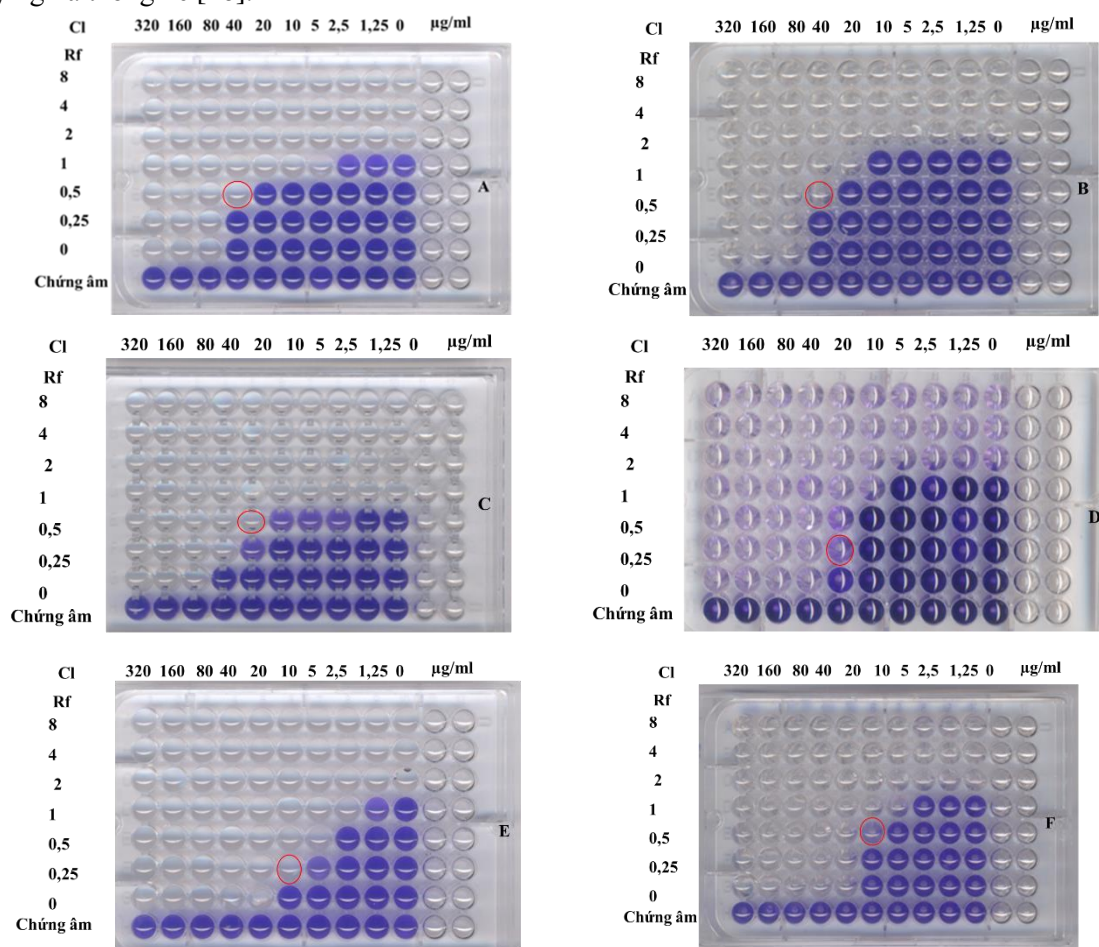
Hình 4. Mối liên hệ giữa môi trường nuôi cấy và sự hình thành biofilm



Hình 5. Mối tương quan giữa chủng đề kháng và sự hình thành biofilm

3.1.2. Khảo sát mối liên quan giữa chủng đề kháng với sự hình thành biofilm

Mối tương quan giữa sự đề kháng và sự hình thành biofilm được trình bày ở hình 5. Ở ngày đầu (ngày 0) khi chưa tiếp xúc với kháng sinh, giá trị MIC là 64 $\mu\text{g/mL}$ và OD 595nm có giá trị là 0,821. Giá trị MIC và OD 595 nm có sự biến động theo từng ngày (từ ngày 1-20) nhưng đến ngày thứ 20 trở lên bắt đầu có sự ổn định giá trị MIC và OD 595 nm. Ở ngày thứ 30 đạt được giá trị MIC 256 $\mu\text{g/mL}$ tăng 4 lần so với giá trị MIC ngày 0 (64 $\mu\text{g/mL}$). Và giá trị OD ngày thứ 30 đạt 3,699 tăng 4 lần so với giá trị OD 595nm ngày 0 (0,821). Thử nghiệm này đánh giá được sự tương quan giữa MIC và sự hình thành biofilm, cho thấy rằng MIC tỉ lệ thuận với mức độ hình thành biofilm (với hệ số tương quan của $R^2=0,654>0,5$ mức độ tương quan mạnh; $p<0,010$), có ý nghĩa thống kê [10].



Hình 6. Kết quả khả năng ức chế hình thành biofilm của colistin và rifampicin

3.1.3. Ứng dụng khảo sát khả năng ức chế hình thành biofilm

Chú thích: A: ATCC 27853, B: ATCC 27853 có giá mang, C: ATCC 9027, D: ATCC 9027 có giá mang, E: PA0, F: PA 02 giá mang

$$FIC = \frac{MIC \text{ colistin trong phối hợp}}{MIC \text{ colistin đơn chất}} + \frac{MIC \text{ Rifampicin trong phối hợp}}{MIC \text{ Rifampicin đơn chất}}$$

Kết quả thí nghiệm bản cờ được trình bày ở hình 6 và bảng 1. Ở mật độ $1-2 \times 10^6$ CFU/ml cho thấy MIC của colistin đối với chủng ATCC 27853, PA02 là 2 ($\mu\text{g/mL}$), với chủng ATCC 9027 là 1-2 ($\mu\text{g/mL}$) và MIC của rifampicin đối với các chủng có sự khác nhau. Sau khi phối hợp giữa colistin và rifampicin thì MIC cả hai kháng sinh đều giảm. Chủng ATCC ATCC27853, ATCC

9027 và PA 02 có giá trị $FIC = 0,75 \leq 1$, riêng ATCC 9027 giá mang và PA 02 có giá trị $FIC = 0,625 \leq 1$. Như vậy, rifampicin và colistin làm tăng đáng kể khả năng ức chế biofilm so với đơn lẻ sau 24 giờ [13], [14].

Bảng 1. MIC và FIC

Chủng	MIC(μ g/ml)	MIC Colistin đơn chất	MIC Rifampicin đơn chất	MIC Colistin phối hợp	MIC Rifampicin phối hợp	FIC
ATCC 27853		2	80	0,5	40	0,75
ATCC 27853 giá mang		2	80	0,5	40	0,75
ATCC 9027		1	80	0,5	20	0,75
ATCC 9027 giá mang		2	40	0,25	20	0,625
PA02		2	20	0,25	10	0,625
PA02 giá mang		2	20	0,5	10	0,75

3.2. Bàn luận

Pa là nguyên nhân thường gặp của nhiễm khuẩn bệnh viện, chiếm 11 – 13,8% trường hợp nhiễm khuẩn khi có kết quả định danh vi khuẩn và tại ICU thì tỷ lệ này còn cao hơn với 13,2 – 22,6% trường hợp được báo cáo [2]. Một nghiên cứu về tình hình kháng kháng sinh của *Pa* phân lập được trên các mẫu bệnh phẩm tại Viện Pasteur Tp. HCM năm 2014, cho thấy *Pa* kháng hầu hết với các kháng sinh thường sử dụng trong điều trị. Mức độ đề kháng cụ thể như sau: colistin (10,7%), fosfomycin (24%), aztreonam (36%), amikacin (42,9%), ciprofloxacin (48,2%), cefepim (45,8%), imipenem (46,2%), gentamicin (55,6%), cefoperazon (54,2%), ticarcillin/ acid clavulanic (54,2%), tobramycin (54,2%), piperacillin (60,7%). Tỷ lệ này cho thấy mức độ đề kháng kháng sinh của *Pa* là khá cao [1]. Theo Flemming, vi khuẩn có khả năng đề kháng với các tác nhân gây hại (chất kháng sinh, chất điện hoạt bề mặt...) cao gấp 1000 lần khi gắn kết với nhau và hình thành biofilm so với dạng vi khuẩn tự do [15]. Mạng lưới các hợp chất ngoại bào của biofilm có khả năng giúp tế bào chống lại tác động của kim loại nặng, các ion và chất độc, giúp vi khuẩn tránh khỏi rất nhiều yếu tố từ môi trường như kháng sinh, chất điện hoạt, chất sát khuẩn, tia UV, pH. Nhiều mô hình sinh trưởng biofilm *in vitro* đã được tiến hành và phát triển nhằm đánh giá các phương pháp điều trị nhiễm khuẩn đến biofilm. 96-MWP là một trong những mô hình được sử dụng rộng rãi nhất trong nghiên cứu về hình thành biofilm. Đồng thời, 96-MWP là mô hình phù hợp nhất trong việc sàng lọc thuốc vì số lượng tạo thành biofilm nhiều trong một lần thực hiện, phù hợp với nhiều loài vi khuẩn và chỉ cần một lượng nhỏ mẫu thử [7]. Theo Coffey và cộng sự [7], tồn tại sự tương quan giữa các môi trường nuôi cấy nghèo dinh dưỡng và giàu dinh dưỡng với quá trình hình thành biofilm của vi khuẩn. Kết quả thí nghiệm cho thấy, môi trường nuôi cấy giàu dinh dưỡng sẽ tăng khả năng hình thành biofilm [7]. Ngoài ra, khi chèn các giá mang vào phiên 96 giếng làm gia tăng biofilm thêm nữa, điều này cho thấy khi bệnh nhân có các can thiệp lâm sàng (đặt stent, nong động mạch, catheter, nội soi, hệ thống chạy thận nhân tạo,...) nếu nhiễm *Pa* thì khả năng số lượng biofilm hình thành nhiều dẫn đến giảm hiệu quả điều trị [6]. Hơn nữa, nghiên cứu khảo sát mối liên hệ giữa MIC và sự hình thành biofilm cho thấy khi MIC tăng thì số lượng biofilm cũng tăng. Kết quả này tương đồng với kết quả nghiên cứu trước đó của M. Yasir [10]. Kháng sinh được chọn là ciprofloxacin có phổ rộng trên gram âm và thường được sử dụng để điều trị nhiễm trùng do *Pa* [10]. Cơ chế đề kháng ciprofloxacin là kiểu thu nhận gen đột biến mã hóa cho các protein bơm ngược, dẫn đến tăng biểu hiện bơm này làm giảm hiệu quả của kháng sinh [9]. Ở ngày đầu khi chưa tiếp xúc với kháng sinh, giá trị OD của vi khuẩn còn thấp, chứng tỏ khả năng hình thành biofilm còn yếu, nhưng khi đã tiếp xúc với kháng sinh trong dài ngày thì giá trị OD thu được càng cao. Từ ngày 1-20, chủng vi khuẩn có sự biến đổi để thích nghi với môi trường có kháng sinh. Nhưng đến ngày thứ 20 thì vi khuẩn tạo chủng đề kháng ổn định và giá trị OD càng cao. Điều này cho thấy rằng nồng độ kháng sinh cao tăng cường khả năng hình thành biofilm ở vi khuẩn. Nếu bệnh nhân không tuân thủ đúng phác đồ điều trị khi dùng kháng sinh, dẫn đến tạo chủng đề kháng thì khả năng hình thành biofilm càng cao.

Hiểu được sự khó khăn trong điều trị vi khuẩn khi hình thành biofilm, nghiên cứu xây dựng mô hình biofilm trên phiên 96 giếng để khảo sát sự hình thành và ứng dụng thử nghiệm các kháng sinh hiện có để ức chế hình thành biofilm. Kháng sinh ciprofloxacin có phổ rộng trên gram âm và thường được sử dụng điều trị nhiễm trùng do *Pa* [10]. Tuy nhiên, khi thực hiện thử nghiệm với ciprofloxacin độ ổn định không cao nên chuyển sang hai kháng sinh có độ ổn định cao hơn là colistin và rifampicin. Ngoài ra, theo Hiệp hội bệnh truyền nhiễm Hoa Kỳ, colistin được lựa chọn thay thế khi các kháng sinh khác không còn nhạy và khuyến cáo nên phối hợp với rifampicin để tăng hiệu quả kháng khuẩn trên vi khuẩn gram âm [13], [14], [16]. Ở thí nghiệm này, nghiên cứu sử dụng hai kháng sinh là colistin và rifampicin để đánh giá hiệu quả ức chế sự hình thành biofilm [14]. Colistin tăng tính thấm qua màng tế bào để cho rifampicin xâm nhập vào bên trong, gây ức chế tổng hợp RNA của vi khuẩn [14]. Ngoài ra, mô hình này có thể được ứng dụng trong đánh giá các chất tiềm năng có khả năng ức chế và phá hủy biofilm.

4. Kết luận

Mô hình tạo thành biofilm được thực hiện trên phiên 96 giếng đơn giản, hiệu quả, nhanh chóng và chi phí thấp hơn so với các hệ thống nuôi cấy khác. Mô hình này không cần đòi hỏi các phương tiện phức tạp đắt tiền nhưng vẫn đánh giá được hiệu quả của các chất tiềm năng. Hơn nữa, thời gian thực hiện đánh giá khả năng hình thành biofilm của vi khuẩn cũng như tác động của kháng sinh đối với biofilm nhanh chóng chỉ trong vòng 3-5 ngày. Nghiên cứu cho thấy quá trình hình thành biofilm liên quan đến chủng loài vi khuẩn, môi trường nuôi cấy, giá mang và MIC. Hai kháng sinh colistin và rifampicin hiệp đồng bổ sung ức chế sự hình thành biofilm.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu được thực hiện tại Bộ Môn Vi sinh - Ký sinh, Khoa Dược – Đại học Y Dược thành phố Hồ Chí Minh và dựa trên nguồn kinh phí của TS. Nguyễn Minh Thái theo hợp đồng số 47/2023/HĐ-ĐHYD.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] H. D. Canh, "Investigating antibiotic resistance of *Pseudomonas Aeruginosa* isolated from various specimens at Ho Chi Minh City Pasteur Institute," Master's Thesis in Biology, Major in Microbiology, Ho Chi Minh University of Education, 2014.
- [2] H. Pelling *et al.*, "Bacterial biofilm formation on indwelling urethral catheters," *Letters in applied microbiology*, vol. 68, no. 4, pp. 277-293, 2019.
- [3] T. H. Hoang *et al.*, "Examining features of antibiotic resistance and a correlation between genotypes of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from different specimens at Viet Duc Hospital," *Vietnam Journal of Science and Technology*, vol. 60, no. 12, pp. 14-18, 2018.
- [4] M. T. T. Thi, D. Wibowo, and B. H. J. I. J. O. M. S. Rehm, "*Pseudomonas aeruginosa* biofilms," *International journal of molecular sciences*, vol. 21, no. 22, 2020, Art. no. 8671.
- [5] C. J. N. Willyard, "Drug-resistant bacteria ranked," *Nature*, vol. 543, no. 7643, p. 15, 2017.
- [6] S. Khoddami, B. H. Chew, and D. J. T. J. O. U. Lange, "Problems and solutions of stent biofilm and encrustations: A review of literature," *Turkish Journal of Urology*, vol. 46, no. Suppl 1, p. S11, 2020.
- [7] B. M. Coffey and G. G. J. P. M. Anderson, "Biofilm formation in the 96-well microtiter plate," *Pseudomonas methods and protocols*, vol. 1149, pp. 631-641, 2014.
- [8] J. A. Gray *et al.*, "High-throughput screening of biofilm formation of *Listeria monocytogenes* on stainless steel coupons using a 96-well plate format," *Listeria Monocytogenes: Methods and Protocols*, vol. 2220, pp. 115-122, 2021.
- [9] A. Rehman, W. M. Patrick, and I. L. J. J. O. M. M. Lamont, "Mechanisms of ciprofloxacin resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: new approaches to an old problem," *Journal of Medical Microbiology*, vol. 68, no. 1, pp. 1-10, 2019.
- [10] M. Yasir, D. Dutta, and M. D. J. M. Willcox, "Activity of antimicrobial peptides and ciprofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms," *Molecules*, vol. 25, no. 17, 2020, Art. no. 3843.

-
- [11] S. N. Jain *et al.*, "Antibiotic synergy test: Checkerboard method on multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa*," *Int. Res. J. Pharm*, vol. 2, no. 12, pp. 196-198, 2011.
- [12] F. J. A. S. M. Alshareef, "Protocol to Evaluate Antibacterial Activity MIC, FIC and Time Kill Method," *Acta Scientific MICROBIOLOGY (ISSN: 2581-3226)*, vol. 4, pp. 02-06, 2021.
- [13] H. J. Lee *et al.*, "Synergistic activity of colistin and rifampin combination against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in an in vitro pharmacokinetic/pharmacodynamic model," *Antimicrobial agents and chemotherapy*, vol. 57, no. 8, pp. 3738-3745, 2013.
- [14] Y. G. Ju *et al.*, "In vitro synergistic antimicrobial activity of a combination of meropenem, colistin, tigecycline, rifampin, and ceftolozane/tazobactam against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*," *Scientific Reports*, vol. 12, no. 1, 2022, Art. no. 7541.
- [15] D. Fleming *et al.*, "Glycoside hydrolases degrade polymicrobial bacterial biofilms in wounds," *Antimicrobial agents and chemotherapy*, vol. 61, no. 2, 2017, Art. no. e01998-16.
- [16] P. J. Krause *et al.*, "Clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America (IDSA): 2020 guideline on diagnosis and management of babesiosis," *Clinical Infectious Diseases*, vol. 72, no. 2, 2021, Art. no. e49-e64.