

## Assessment of various detection methods of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* clinical isolates

Mozhgan Pirmoradian, Mohsen Zargar\*, Razieh Nazari

Department of Microbiology, Islamic Azad University, Qom Branch, Qom, Iran

\* Corresponding author e-mail: [zmohsen2002@yahoo.com](mailto:zmohsen2002@yahoo.com)

**Citation:** Pirmoradian M, Zargar M, Nazari R. Assessment of various detection methods of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *Daneshvar Medicine* 2022; 30(5):1-15.  
doi: 10.22070/DANESHMED.2022.16238.1215

### Abstract

**Background and Objective:** As an important factor in pathogenicity, the ability of *Staphylococcus aureus* to produce biofilm increases its stability in the environment and living host. Biofilms formed by *S.aureus*, especially those related to the implant of medical devices, can act as a physical barrier against antibiotics and the host's immune system, leading to chronic or persistent infections. Hence, implementation of efficient diagnostic tests for the detection of biofilm formation can help reduce the disease burden. The purpose of this study was to assess different methods for the detection of biofilm formation in 40 *S.aureus* isolates.

**Materials and Methods:** A total of 40 non-duplicate *S. aureus* clinical isolates were identified. Biofilm formation was detected by Tissue Culture Plate (TCP), tube method (TM) and Congo red agar (CRA) methods and PCR assay was used to detect *icaA* and *icaD* genes.

**Results:** Among all *S. aureus* isolates, 21(52.5%) contained both *icaA* and *icaD* genes and *icaD* gene was present in all biofilm positive isolates. Tissue culture plate, Congo red agar, and tube method detected 30%, 42.5%, and 67.5% biofilm formation isolates, respectively.

**Conclusion:** According to the results, tissue culture plate with supplemented glucose showed the best correlation with the results of molecular assay and can be used as a reliable method to detect biofilm formation in clinical isolates of *S. aureus*.

**Keywords:** *Staphylococcus aureus*, Biofilm, PCR technique, Ica genes

Received: 10 Oct 2022  
Last revised: 14 Nov 2022  
Accepted: 24 Dec 2022

# ارزیابی روشهای مختلف تشخیص تولید بیوفیلم در جدایه های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس

نویسندگان: مژگان پیرمادیان، محسن زرگر\*، راضیه نظری

گروه میکروب شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، قم، ایران

Email: zmohsen2002@yahoo.com

\*نویسنده مسئول: محسن زرگر

## مقاله پژوهشی

### چکیده

**مقدمه و هدف:** توانایی استافیلوکوکوس اورئوس برای تولید بیوفیلم، به عنوان یک عامل مهم در بیماری‌زایی، پایداری آن را در محیط و میزبان زنده افزایش می‌دهد. بیوفیلیم‌های تشکیل شده توسط استافیلوکوکوس اورئوس، به ویژه آنهایی که با ایمپلنت دستگاه‌های پزشکی مرتبط هستند، می‌توانند به عنوان یک مانع فیزیکی در برابر آنتی بیوتیک‌ها و سیستم ایمنی میزبان عمل کرده، منجر به عفونت‌های مزمن یا پایدار شوند. از این رو، انجام آزمایش‌های تشخیصی کارآمد برای شناسایی تولید بیوفیلم، می‌تواند به کاهش معضل بیماری کمک کند. هدف از این مطالعه، ارزیابی روش‌های مختلف تشخیص تشکیل بیوفیلم در ۴۰ جدایه بالینی استافیلوکوکوس اورئوس بود.

**مواد و روش‌ها:** در مجموع ۴۰ جدایه بالینی غیر تکراری استافیلوکوکوس اورئوس، شناسایی شدند. تشکیل بیوفیلم با استفاده از روش‌های صفحه کشت بافت (TCP)، روش لوله (TM) و کنگو رد آگار (CRA) بررسی شد و برای تشخیص ژن‌های icaA و icaD از آزمایش PCR استفاده گردید.

**نتایج:** در میان جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس، ۲۱ (۵۲/۵٪) جدایه دارای هر دو ژن icaA و icaD بودند و ژن icaD در تمام جدایه‌های بیوفیلم مثبت حضور داشت. صفحه کشت بافت کنگو رد آگار و روش لوله، به ترتیب ۳۰٪، ۴۲/۵٪ و ۶۷/۵٪ از جدایه‌ها را تولیدکننده بیوفیلم شناسایی کردند.

**نتیجه‌گیری:** طبق نتایج، روش صفحه کشت بافت به همراه گلوکز، بهترین همبستگی را با نتایج آنالیز مولکولی نشان داد و می‌تواند به عنوان یک روش قابل اعتماد برای تشخیص تشکیل بیوفیلم در جدایه‌های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس بکار رود.

**واژه‌های کلیدی:** استافیلوکوکوس اورئوس، بیوفیلم، روش PCR، ژن‌های ica

دریافت: ۱۴۰۱/۰۷/۱۸

آخرین اصلاح‌ها: ۱۴۰۱/۰۹/۲۳

پذیرش: ۱۴۰۱/۱۰/۰۳

## مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس، یک پاتوژن فرصت طلب انسانی است که در میکروبیوتای غشای مخاطی و پوست یافت شده و قادر به ایجاد انواع عفونتهای مرتبط با مراقبت های بهداشتی (Healthcare Associated Infections) در تمام گروه های سنی می باشد. این باکتری بیماریزا علاوه بر عفونتهای پوست و بافت نرم به طور گسترده ای به عنوان عامل بیماری های تهاجمی شدید مانند استئومیلیت، شناخته می شود (۲،۱) و یکی از عوامل اصلی عفونتهای اکتسابی از بیمارستان و جامعه در سراسر جهان است (۳). این پاتوژن، در حفره های بینی ۲۰ تا ۸۰ درصد جمعیت انسانی کلونیزه می شود (۴) و ناقلین بینی استافیلوکوکوس اورئوس می توانند یک عامل خطر اصلی برای عفونت محل جراحی در جراحیهای ارتوپدی با ایمپلنت باشند (۵). توانایی استافیلوکوکوس اورئوس، در ایجاد عفونتهای متنوع پایدار عمدتاً به دلیل کسب مقاومت در برابر داروهای متعدد دارا بودن طیف وسیعی از فاکتورهای حدت و توانایی تولید بیوفیلم در ایمپلنت های پزشکی می باشد (۶). بیوفیلم ها، اجتماعی از سلول های میکروبی هستند که به سطوح زنده یا غیر زنده چسبیده و در یک ماتریکس خارج سلولی متشکل از پروتئین ها، DNA خارج سلولی و آگزوپلی ساکاریدها، محصور شده اند (۷). باکتریها در درون بیوفیلم در مقایسه با سبک زندگی پلانکتونی آنها ۱۰۰-۱۰۰۰ برابر نسبت به ترکیبات ضد میکروبی مقاوم ترند (۸).

انستیتو ملی سلامت آمریکا تخمین زده است که بیش از ۸۰٪ از عفونتهای باکتریایی انسان، می توانند با تشکیل بیوفیلم مرتبط باشند (۹). بیوفیلم ها، در برابر بسیاری از آنتی بیوتیک ها و سایر عوامل استرس زا به عنوان یک مانع عمل کرده و سد ورود آنها به سلول ها می شوند و همچنین در برابر ایمنی میزبان از سلولهای باکتریایی دفاع می کنند (۱۰-۱۴) و به دلیل دشواری درمان عفونت ها، به ویژه آنهایی که در دستگاههای تهاجمی مانند ایمپلنت ها تشکیل می شوند، سبب افزایش میزان مرگ و میر و هزینه های بیمارستانی خواهند شد (۹). استافیلوکوکوس اورئوس، یکی از علل شایع عفونتهای مرتبط با ایمپلنت و شایعترین علت عفونت ایمپلنت ارتوپدی می باشد (۱۷)-

(۱۵). توانایی این باکتری برای تشکیل بیوفیلم در سطوح زنده و غیر زنده، ویژگی اصلی بیماریزایی آن است (۱۸) و ادهسین بین سلولی پلی ساکاریدی Polysaccharide Intracellular Adhesin (PIA)، مولکول زیستی اصلی مسئول تجمع سلولی و تشکیل بیوفیلم است. بیوسنتر PIA، بوسیله پروتئین های کدگذاری شده توسط اپران ica (icaADBC) انجام می شود (۱۹). در میان ژنهای چسبندگی بین سلولی (intracellular adhesion, ica)، ژنهای icaA و icaD، نقش بسزایی در تشکیل بیوفیلم دارند (۲۰). در واقع ژنهای ica، مکانیسم های چسبندگی را تسهیل نموده و در پیشرفت پاتوژن دخالتهای دارند که اهمیت این ژن ها را در بیماریزایی باکتری به خصوص در ارتباط با دستگاه های پزشکی جایگذاری شده نشان می دهد (۲۱). با توجه به اینکه عفونتهای استافیلوکوکی مرتبط با وسایل پزشکی تاثیر قابل توجهی بر عوارض مرگ و میر و هزینه های اقتصادی-اجتماعی دارند، پیشگیری و مدیریت این گونه عفونت ها در اولویت است. تشخیص و تمایز توانایی استافیلوکوک ها برای تشکیل بیوفیلم در آزمایشگاه های بالینی، اهمیت زیادی برای شروع اقدامات درمانی مؤثر دارد و درمان های آنتی بیوتیکی ناموفق را به حداقل می رساند (۲۲). روش های فنوتیپی مختلفی از جمله CRA، TM، TCP، میکروسکوپ الکترونی، میکروسکوپ اسکن کانفوکال و سنسجش بیولومینسانس برای تشخیص بیوفیلم در عفونتهای استافیلوکوکی، در دسترس هستند (۲۳). به طور معمول، بررسی تولید بیوفیلم در عفونتهای استافیلوکوکی با استفاده از یک روش فنوتیپی به همراه تشخیص ژنها در اپران ica، انجام می گیرد (۲۴). هدف از مطالعه حاضر، ارزیابی و مقایسه حساسیت و ویژگی سه روش فنوتیپی CRA، TM و TCP با روش PCR برای تشخیص توانایی تولید بیوفیلم در جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس بود.

## مواد و روش‌ها

### جداسازی و شناسایی جدایه ها

این مطالعه گذشته نگر، بر روی تعداد ۴۰ جدایه استافیلوکوکوس اورئوس غیر تکراری که از دست‌ها (۱۴ جدایه) و حفره های بینی (۲۶ جدایه) پرسنل تیم جراحی ارتوپدی بیمارستان گلپایگانی و دی کلینیک فارابی قم از بهمن ماه ۱۳۹۷ تا شهریور ماه ۱۳۹۸ جمع‌آوری شده بودند انجام گرفت. نمونه‌های جمع‌آوری شده به آزمایشگاه میکروبیشناسی دانشگاه آزاد قم، انتقال یافتند و در پلیت‌های تریپتیکاز سوی آگار (Merck, Germany) حاوی ۰.۵٪ خون گوسفند، تلقیح و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرماگذاری شدند. سپس، جدایه‌ها روی محیط مانیتول سالت آگار (Merck, Germany) در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ تا ۷۲ ساعت، کشت مجدد داده شدند. جدایه‌ها بوسیله روشهای باکتری شناسی استاندارد شامل: مورفولوژی کلنی روی نوترین آگار، رنگ آمیزی گرم، همولیز، تخمیرند مانیتول، فعالیت کاتالازی، کوآگولاز لوله و آزمون DNase، شناسایی شدند (۲۵).

### غریبالگری جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین (MRSA)

غریبالگری جدایه‌های مقاوم به متی‌سیلین، با روش انتشار از

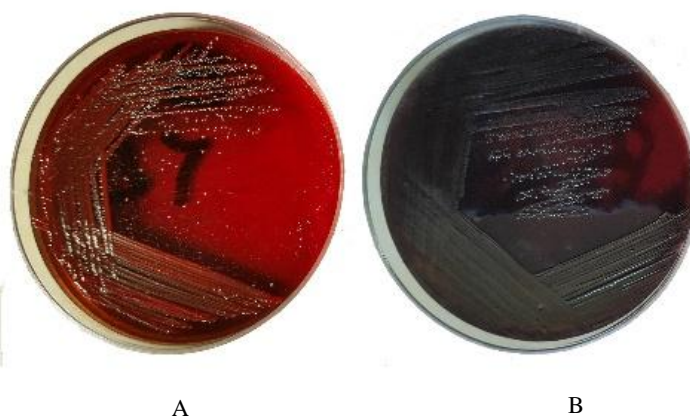
دیسک کربی-بائر و با استفاده از دیسک آنتی بیوتیکی سفوکسیتین (HiMedia, India,  $\mu\text{g}$  30) مطابق با دستورالعمل‌های CLSI 2019 انجام گرفت (۲۶) و بوسیله شناسایی ژن *mecA* با استفاده از پرایمر اختصاصی که قبلاً توضیح داده شده است (۲۷) تایید شد. جدایه‌ها، تا زمان استفاده بعدی در دمای ۸۰- درجه سانتیگراد، نگهداری شدند. استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 25923 به عنوان کنترل منفی (*-mecA*) و استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 33592 به عنوان کنترل مثبت (*+mecA*) استفاده شدند.

### بررسی تولید بیوفیلم در جدایه ها

برای شناسایی جدایه‌های مولد بیوفیلم در شرایط آزمایشگاهی از دو روش کیفی CRA و TM و روش کمی TCP استفاده شد.

### روش کنگورد آگار (CRA)

در این روش، جدایه‌ها روی پلیت های CRA (برین هرت اینفوژن آگار همراه با ۰/۸ گرم بر لیتر رنگ کنگورد و ۵۰ گرم بر لیتر ساکارز) (Merck, Germany) تلقیح و در دمای ۳۷ درجه برای ۲۴ ساعت انکوبه شدند (۲۸). کلنی‌های سیاه رنگ تولیدکننده‌های بیوفیلم و کلنی‌های قرمز، منفی در نظر گرفته شدند (شکل ۱).



شکل ۱. ارزیابی تولید بیوفیلم در جدایه های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس با روش کنگورد آگار (CRA)

A: کلنی های قرمز نشان دهنده عدم توانایی تشکیل بیوفیلم

B: جدایه های تولید کننده بیوفیلم با کلنی های سیاه

**روش کدورت در لوله (TM)**

روش TM همانطور که قبلا شرح داده شده است (۲۹) انجام گرفت. به طور خلاصه، جدایه‌ها در لوله های حاوی ۵ میلی لیتر تریپتیکاز سوی برات (Merck, Germany) تلقیح و به مدت ۲۴ ساعت گرما گذاری شدند. پس از خارج کردن محتویات لوله‌ها و شستشوی آنها با بافر فسفات (PH=۷/۳) لوله‌ها خشک و با رنگ کریستال ویوله

۰/۱٪ رنگ آمیزی شدند. شکل گیری یک لایه نازک قابل مشاهده در امتداد دیواره داخلی و پایین لوله‌ها، نمایانگر تشکیل بیوفیلم است. بر این اساس، جدایه‌ها به ترتیب ۰، ۱، ۲ و ۳ برای عدم تشکیل بیوفیلم، بیوفیلم ضعیف، متوسط و قوی طبقه بندی شدند (شکل ۲).



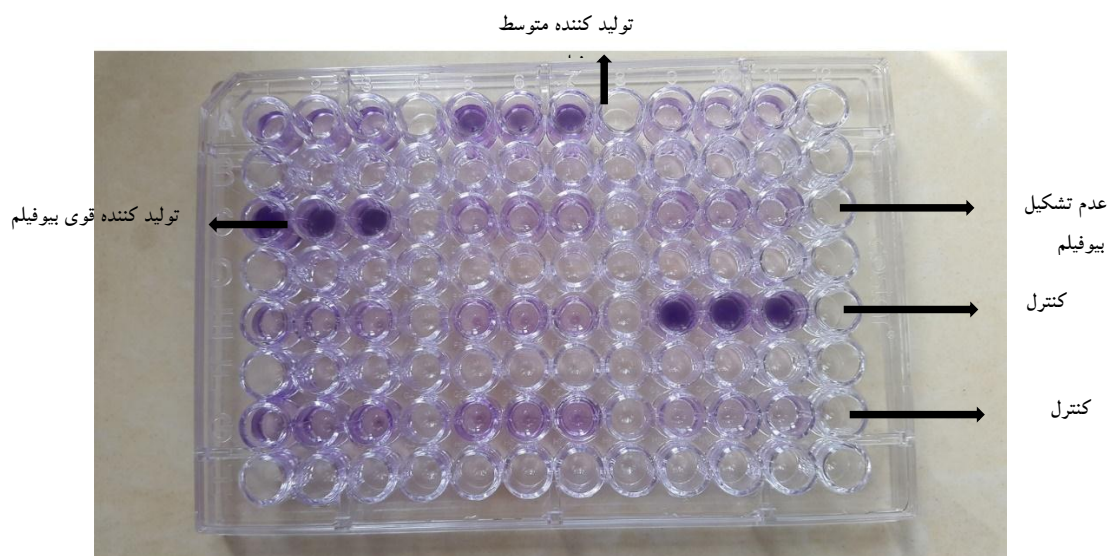
شکل ۲. سنجش تشکیل بیوفیلم در جدایه های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس با روش لوله (TM)

**a** : مشاهده لایه ضخیم قابل رؤیت در جدار و ته لوله: بیوفیلم قوی. **b** : مشاهده یک لایه نازک قابل رؤیت در جدار و ته لوله: بیوفیلم متوسط. **c** : عدم مشاهده لایه قابل رؤیت در جدار لوله: بیوفیلم ضعیف. **d** : عدم مشاهده لایه قابل رؤیت در جدار و ته لوله: بیوفیلم منفی. **e** : بلانک

**روش صفحه کشت بافت (TCP)**

تشکیل بیوفیلم با روش TCP، درون چاهک‌های استریل میکروپلیت ۹۶ خانه پلی استایرن (Costar®, USA)، همانطور که توسط Christensen و همکارانش توضیح داده شده است (۳۰)، با اندکی تغییر در طول زمان گرما گذاری از ۱۸ به ۲۴ ساعت با استفاده از تریپتیکاز سوی برات (Merck, Germany, TSB) و TSB حاوی ۱٪ گلوکز مورد ارزیابی قرار گرفت. چگالی نوری (OD) چاهک های رنگ شده با کریستال ویوله (شکل ۳)، توسط دستگاه خوانش ( EPOCH2 Microplate Readers )

(BioTek, USA) و در طول موج ۴۹۲ نانومتر، با ۱۰۰ میکرولیتر اتانول و بدون آن اندازه گیری شدند. بررسی کمی تولید بیوفیلم توسط جدایه‌ها با استفاده از فرمول قراردادی و مطابق با جدول ۱ انجام پذیرفت (۳۱). جهت حصول اطمینان از صحت کار، آزمایش های فوق برای هر جدایه سه بار تکرار شدند و از استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 35556، سویه تولید کننده بیوفیلم، به عنوان مرجع در تمامی آزمایش ها استفاده گردید.



شکل ۳. غربالگری جدایه های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس تولیدکننده بیوفیلم به روش صفحه کشت بافت (TCP): تولیدکننده قوی بیوفیلم، تولیدکننده متوسط بیوفیلم، عدم تشکیل بیوفیلم و کنترل مثبت و منفی، تمایز یافته با رنگ آمیزی کریستال ویوله در صفحه کشت بافت ۹۶ خانه

جدول ۱. تفسیر نتایج تشکیل بیوفیلم در جدایه های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس با روش صفحه کشت بافت (TCP)

فرمول استفاده شده	قوی	متوسط	ضعیف	عدم اتصال
$BF^a = AB^b - CW^c$	$\geq 0/300$	0/200-0/299	0/100-0/199	$< 0/100$

a: biofilm formation; b: stained attached bacteria; c: stained control wells

ارزیابی ژنوتیپی (Waltham, MA, USA) توالی پرایمرهای مورد استفاده (Metabion, Germany) در جدول ۲ و شرایط تکثیر در جدول ۳ نشان داده شده است. محصولات PCR، با استفاده از ژل آگارز ۲ درصد حاوی رنگ سایبر ایمن (Invitrogen, USA)، مورد ارزیابی قرار گرفتند (۲۰،۲۳). برای تعیین اندازه محصولات PCR، از نشانگر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی (SMOBIO) استفاده شد.

### ارزیابی ژنوتیپی

برای شناسایی ژنهای *icaA*، *mecA* و *icaD*، از واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) استفاده گردید (جدول ۲). DNA ژنومی با استفاده از کیت استخراج DNA بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده Exgene TM Clinic SV kits (Gene All Biotechnology Co. Ltd, Korea) استخراج گردید. علاوه بر آن، کمیت و کیفیت DNA ژنومی با استفاده از اسپکتوفتومتر نانودراپ ND-1000 (Thermo Fisher Scientific Inc.,

جدول ۲. پرایمرهای مورد استفاده برای شناسایی ژن های *icaD*، *icaA*، *mecA*

نام ژن	توالی پرایمرها	اندازه محصول (جفت باز)	منبع
<i>mecA</i>	F: GTAGAAATGACTGAACGTCGGATAA R: CCAATTCACATTGTTCCGGTCTAA	314	(27)
<i>icaA</i>	F: TCTCTTGCAAGGAGCAATCAA R: TCAGGCACTAACATCCAGCA	188	(32)
<i>icaD</i>	F: ATGGTCAAGCCCAGACAGAG R: CGTGTTCACATTTAATGCAA	198	(32)

جدول ۳. برنامه دمایی واکنش PCR برای ژن های *icaD* و *icaA mecA*

منبع	برنامه (Temp <sup>o</sup> C/Time) 35 سیکل					ژن های هدف
	گسترش نهایی	گسترش	اتصال	واسرشت	واسرشت اولیه	
(27)	72°C/10min	72°C/80 s	58°C/30 s	95°C/30 s <sup>c</sup>	95°C/5 min <sup>b</sup>	<i>mecA</i>
(32)	72°C/1min	72°C/30 s	55.5°C/30 s	94°C/30 s	94°C/5 min	<i>icaA</i>
(32)	72°C/1min	72°C/30 s	55.5°C/30 s	94°C/30 s	94°C/5 min	<i>icaD</i>

Temp<sup>o</sup>: Temperature, min<sup>b</sup>: Minutes, s<sup>c</sup>: Second

## تجزیه و تحلیل آماری

مقاومت به متی سیلین، با استفاده از روش انتشار از دیسک و PCR برای ژن *mecA*، بررسی شد و نتایج نشان دادند که ۱۰۰٪ جدایه ها، مقاوم به آنتی بیوتیک متی سیلین و واجد ژن *mecA* بودند. در آزمایش CRA، ۱۷ (۵۲٪) جدایه، بیوفیلم مثبت و ۲۳ (۵۷٪) جدایه منفی بودند. سنجش تولید بیوفیلم با روش TCP در مقایسه با حضور ژنهای *ica* از نظر آماری معنی دار بود، در حالیکه با روشهای CRA و TM از نظر آماری بی اهمیت بود (جدول ۴ و ۵).

در ابتدا، حساسیت و ویژگی روشهای فنوتیپی در مقایسه با روش ژنوتیپی ارزیابی شدند. سپس، روشهای فنوتیپی با روش TCP به عنوان استاندارد طلایی مقایسه شدند (۲۳). نتایج با استفاده از نرم افزار آماری SPSS نسخه ۲۱ (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) و آزمون مربع کای و سطح اطمینان ۹۵٪ (P<۰/۰۰۵) آنالیز گردید.

## نتایج

از مجموع ۴۰ جدایه مورد بررسی، ۲۱ (۵۲٪) جدایه، دارای هر دو ژن *icaA* و *icaD* بودند (جدول ۴).

جدول ۴. غربالگری جدایه های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس تولیدکننده بیوفیلم با سه روش مختلف فنوتیپی CRA، TM و TCP و روش ژنوتیپی

ژنهای <i>ica</i>	TCP	TM	CRA	تولید بیوفیلم
قوی	۷ (۱۷٪)	۱۳ (۳۲٪)	۱۷ (۴۲٪)	۲۱ (۵۲٪)
متوسط	۵ (۱۲٪)	۱۴ (۳۵٪)	-	-
ضعیف یا عدم تشکیل	۲۸ (۷۰٪)	۱۳ (۳۲٪)	۲۳ (۵۷٪)	۱۹ (۴۷٪)
P value	< ۰/۰۰۰۱	۰/۹۷۵	۰/۳۴۳	۰/۷۵۲

جدول ۵. بررسی ارتباط تشکیل بیوفیلم در روش های مختلف فنوتیپی CRA، TM و TCP با ژنهای *ica*

تولید بیوفیلم	عدم حضور ژنهای <i>ica</i>			حضور ژنهای <i>ica</i>		
	TCP	TM	CRA	TCP	TM	CRA
قوی	۸ (۳۸٪)	۶ (۳۱٪)	۹ (۴۷٪)	۸ (۳۸٪)	۶ (۳۱٪)	۷ (۳۳٪)
متوسط	۱۱ (۵۲٪)	۵ (۲۶٪)	-	۱۱ (۵۲٪)	۵ (۲۶٪)	-
ضعیف یا عدم تشکیل	۲ (۹٪)	۸ (۴۲٪)	۱۰ (۵۲٪)	۲ (۹٪)	۸ (۴۲٪)	۱۰ (۵۲٪)
جمع کل	۲۱	۱۹	۱۹	۲۱	۱۹	۱۹

بیوفیلم بودند. اضافه کردن ۱٪ گلوکز به محیط TSB، سبب افزایش تولید کننده های بیوفیلم به ۲۱ (۵۲٪) جدایه گردید. مطالعه حاضر، القای تولید بیوفیلم با افزودن ماده مغذی گلوکز را نشان داد. هنگامی که نتایج روش TCP اصلاح شده با سنجش ژنوتیپی مقایسه گردید،

در روش TM، تعداد جدایه های قوی، متوسط و ضعیف، به ترتیب ۱۳ (۳۲٪)، ۱۴ (۳۵٪) و ۱۳ (۳۲٪) بودند (جدول ۴). برای ارزیابی کم تشکیل بیوفیلم از روش TCP با یک تغییر در محیط کشت استفاده شد. در روش TCP با محیط TSB، ۱۲ (۳۰٪) جدایه، تولید کننده

(جدول ۴ و ۷). حساسیت و ویژگی TM نسبت به روش ژنوتیپی به ترتیب ۷۶/۱۹٪ و ۴۲/۱٪ بود (جدول ۷). اما نتایج نشان دادند که روش TCP اصلاح شده، یک روش غربالگری با حساسیت، ویژگی و دقت بالا، برای تشخیص تولید بیوفیلم در جدایه های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس است (جدول ۷). همچنین روشهای CRA، TM و TCP اصلاح شده با روش استاندارد TCP مقایسه شدند. نتایج نشان داد که روش TCP اصلاح شده، قابل اعتمادتر از روشهای بدون مکمل برای تشخیص تولید بیوفیلم استافیلوکوکوس اورئوس می باشد (جدول ۸).

ژنهای *icaAD* در تمامی ۲۱ (۵۲/۵٪) جدایه تولیدکننده بیوفیلم، حضور داشتند (جدول ۵). نتایج ما، تفاوت معنی داری را در تولید بیوفیلم بین روش TCP همراه با اتانول و بدون اتانول نشان نداد (جدول ۶). در عفونتهای استافیلوکوکی برای بررسی تولید بیوفیلم، یک روش فنوتیپی همراه با تشخیص ژنهای دخیل در تشکیل بیوفیلم، مورد استفاده قرار می گیرد (۲۴). در این مطالعه، روشهای CRA، TM و TCP اصلاح شده با استفاده از TSB همراه با ۱٪ گلوکز با روش ژنوتیپی مقایسه شدند. در مقایسه CRA با روش ژنوتیپی حساسیت ۳۸/۰۹٪ و ویژگی ۵۲/۶۳٪ بود که نشان دهنده عدم همبستگی بین روش CRA با روش ژنوتیپی می باشد

جدول ۶. فراوانی تولید بیوفیلم در روش TCP با ترکیبات متفاوت محیط کشت (TSB بدون گلوکز و TSB دارای ۱٪ گلوکز)

تولید بیوفیلم	TSB بدون گلوکز		TSB دارای ۱٪ گلوکز	
	بدون اتانول	همراه با اتانول	بدون اتانول	همراه با اتانول
قوی	۷ (۱۷/۵٪)	۳ (۷/۵٪)	۹ (۲۲/۵٪)	۳ (۷/۵٪)
متوسط	۵ (۱۲/۵٪)	۲ (۵/٪)	۱۲ (۳۰٪)	۱۴ (۳۵٪)
ضعیف یا عدم تشکیل	۲۸ (۷۰٪)	۳۵ (۸۷/۵٪)	۱۹ (۴۷/۵٪)	۲۳ (۵۷/۵٪)

جدول ۷. ارزیابی آماری روش های فنوتیپی کنگو رد آگار (CRA)، روش لوله (TM) و صفحه کشت بافت (TCP) در مقایسه با روش ژنوتیپی برای تشخیص تشکیل بیوفیلم در جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس

روشهای تشخیصی	حساسیت(٪)	ویژگی(٪)	ارزش اخباری مثبت(٪)	ارزش اخباری منفی(٪)	دقت(٪)
CRA	۳۸/۰۹	۵۲/۶۳	۴۷/۰۶	۴۳/۴۸	۴۵
TM	۷۶/۱۹	۴۲/۱	۵۹/۲۶	۶۱/۵۴	۶۰
TCP خشک	۹۰/۴۸	۸۹/۴۷	۹۰/۴۸	۸۹/۴۷	۹۰
TCP با اتانول	۸۰/۹۵	۱۰۰	۱۰۰	۸۲/۶۰	۹۰

جدول ۸. ارزیابی آماری روش های کنگو رد آگار (CRA)، روش لوله (TM) و صفحه کشت بافت (TCP) اصلاح شده در مقایسه با روش TCP استاندارد برای تشخیص تشکیل بیوفیلم در جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس

روشهای تشخیصی	حساسیت(٪)	ویژگی(٪)	ارزش اخباری مثبت(٪)	ارزش اخباری منفی(٪)	دقت(٪)
CRA	۲۵	۵۰	۱۷/۶۵	۶۰/۸۷	۴۲/۵
TM	۷۵	۳۵/۷۱	۳۳/۳۳	۷۶/۹۲	۴۷/۵
گلوکز + TCP خشک	۱۰۰	۳۲/۱۴	۳۸/۷	۱۰۰	۵۲/۵
گلوکز + TCP با اتانول	۴۱/۶۷	۵۷/۱۴	۲۹/۴۱	۶۹/۵۶	۵۲/۵



## بحث

همچنین، در مطالعه Rohde و همکاران (۴۳)، ژنهای *icaA/icaD* در ژنوم ۵۲/۶۳٪ از جدایه‌ها، از جمله در جدایه‌هایی که نتایج CRA برای آنها منفی بود یافت شدند. زالی پور و همکاران نیز در سال ۲۰۱۶ تولید بیوفیلم را در جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس جمع‌آوری شده از نمونه‌های بالینی مختلف مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج مطالعه آنها نشان داد که ۶۳/۳٪ از جدایه‌ها دارای ژنهای *icaAD* بودند (۲۴). اما در تحقیق Piechota و همکاران (۳۶)، فقط ۱۵/۴٪ از جدایه‌های بیوفیلم مثبت، واجد ژنهای *icaAD* بودند که مشابه با نتایج مطالعات محققان دیگر بود (۴۴، ۴۵).

در تحقیق حاضر، تمامی جدایه‌های تولیدکننده بیوفیلم، واجد ژن *icaD* بودند که با یافته‌های مطالعات دیگر، مطابقت دارد (۴۲، ۱۸). همچنین، طی مطالعه‌ای که توسط Grinholc و همکارانش (۴۶) بر روی جدایه‌های بالینی MRSA انجام گرفت ۹۱٪ از جدایه‌ها واجد ژن *icaD* بودند.

اگر چه مطالعات متعددی ارتباط بین حضور ژن *icaD* و تولید بیوفیلم را در جدایه‌های MRSA تایید نموده‌اند (۴۷، ۴۸)، اما در مطالعه Azmi و همکاران (۴۹)، تنها ۱۶/۵٪ از جدایه‌های تولیدکننده بیوفیلم، دارای ژن *icaD* بودند.

در پژوهش ما، بررسی تشکیل بیوفیلم در روش CRA نشان داد که ۱۷ (۴۲/۵٪) جدایه توانایی تولید بیوفیلم بر روی محیط کنگو رد آگار را داشتند. حساسیت و ویژگی این روش در مقایسه با روش ژنوتیپی، به ترتیب ۳۸/۰۹٪ و ۵۲/۶۳٪ بود. در همین رابطه نتایج مطالعه زالی پور و همکاران (۲۴) در شیراز نشان داد که در روش CRA، ۵۴/۴٪ از جدایه‌ها بیوفیلم تولید کردند.

اما نتیجه بررسی‌هایی که توسط John و Murugan در سال ۲۰۱۴ بر روی ۲۰۹ جدایه بالینی MRSA جهت بررسی تشکیل بیوفیلم با سه روش CRA، TM، و TCP

تولید بیوفیلم توسط استافیلوکوکوس اورئوس، به عنوان مهمترین وسیله دفاعی در برابر پاسخ آنتاگونیستی میزبان علاوه بر توانمند ساختن باکتری برای کلونیزه شدن در بافتهای میزبان از حذف این باکتری بیماریزا توسط عوامل ضد میکروبی و پاسخ ایمنی میزبان نیز جلوگیری می کند که منجر به عوارض و مرگ و میر ناشی از پخش متاستازی آبسه می شود (۳۳، ۳۴). همچنین، تشکیل بیوفیلم یکی از شاخص‌های اصلی در شیوع استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین، به عنوان پاتوژن عامل عفونت‌های مرتبط با دستگاه های پزشکی در نظر گرفته شده است (۳۵). از این رو، استفاده از یک روش قابل اعتماد و سریع برای شناسایی جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس تولیدکننده بیوفیلم در مراکز بهداشتی-درمانی ضروری است (۱۰، ۳۵). در این مطالعه، توانایی تشکیل بیوفیلم در ۴۰ جدایه بالینی استافیلوکوکوس اورئوس در شرایط آزمایشگاهی با سه روش فنوتیپی و یک سنجش ژنتیکی مقایسه و ارزیابی شدند. تاکنون چندین مطالعه (۲۰، ۳۶) -۳۸) بر ارتباط میان تشکیل بیوفیلم توسط سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس ایجاد کننده عفونت‌های بیمارستانی و حضور اپران *ica* که در تولید PIA اصلی ترین جزء ماتریکس بیوفیلم استافیلوکوکوسی (۴۰) نقش دارد، تاکید نموده‌اند. در مطالعه ما از مجموع ۴۰ جدایه مورد بررسی، ۱۰۰٪ جدایه‌ها با روش PCR برای *icaD* مثبت بودند و در ۲۱ (۵۲/۵٪) جدایه هر دو ژن *icaA* و *icaD* شناسایی شدند. در مطالعه قادری و همکاران (۴۱)، ژنهای مرتبط با بیوفیلم در ۸۳ جدایه بالینی بررسی شدند و نتایج نشان داد که ۶۰٪ واجد هر دو ژن *icaA* و *icaD* بودند که با نتایج بدست آمده همخوانی دارد.

نتایج مطالعه حاضر با مطالعات Arciola و همکاران (۴۲) و Kouidhi و همکاران (۱) که به ترتیب ۶۰/۸۶٪ و ۵۰٪ از جدایه‌ها، برای هر دو ژن *icaA* و *icaD* مثبت بودند همسو می باشد.

روش ژنوتیپی، حساسیت ۷۶/۱۹٪ و ویژگی ۴۲/۱٪ را نشان داد.

Manandhar و همکاران در سال ۲۰۱۸، سه روش مورد استفاده در مطالعه ما (CRA، TM، و TCP) را با تکنیک PCR که برای شناسایی سویه‌های حامل ژن‌های تولیدکننده بیوفیلم icaAD استفاده شد مقایسه کردند. آنها ۱۴٪ حساسیت و ۸۸/۲٪ ویژگی را برای روش CRA، ۶۴٪ حساسیت و ۷۴/۴٪ ویژگی را برای روش TM، و ۳۰/۲٪ حساسیت و ۷۲٪ ویژگی را برای روش TCP گزارش نمودند. بنابراین، نویسندگان به این نتیجه رسیدند که TM به دلیل حساسیت و ویژگی بالا، بهترین روش برای تشخیص بیوفیلم است (۵۵). همچنین Oliveira و Cunha برای تشخیص جدایه‌های استافیلوکوکوس گواگولاز منفی تولیدکننده بیوفیلم، روش کیفی TM را توصیه کردند و بیان نمودند که TM روشی کم‌هزینه و همراه با نتایج قابل اعتماد است (۵۲).

اما John و Murugan با استفاده از روش TM، ۱۵/۷۸٪ از جدایه‌های MRSA را به عنوان تولیدکننده بیوفیلم گزارش کردند که از نظر تعداد تولیدکننده‌های قوی بیوفیلم با روش TCP همبستگی داشت اما حساسیت و ویژگی آن کمتر بود (۵۰).

در مطالعه Saha و همکاران (۵۶)، در روش TCP، ۶۹٪ از تولیدکنندگان بیوفیلم شناسایی شدند، در حالیکه روش TM فقط ۳۶٪ را شناسایی کرد. آنها همچنین اظهار داشتند که روش TCP می‌تواند بین تولیدکنندگان بیوفیلم قوی و متوسط تمایز قائل شود.

بر اساس نتایج حاصل از پژوهش حاضر و در تایید مطالعات محققین دیگر (۵۸، ۵۷، ۲۳)، ما نمی‌توانیم TM را به عنوان یک روش غربالگری عمومی برای شناسایی جدایه‌های تولید کننده بیوفیلم توصیه نماییم.

در این مطالعه، حساسیت و ویژگی روش TCP بیشتر از سنجش CRA و TM بود و ما به این نتیجه رسیدیم که اگرچه روش کمی TCP یک تکنیک زمان‌بر است اما برای

انجام شد نشان داد که فقط ۹ (۴/۳۰) جدایه در روش CRA مثبت بودند. حساسیت، ویژگی و دقت این روش در مقایسه با روش TCP استاندارد به ترتیب ۱۴/۱۰٪، ۸۶/۷۹٪ و ۳۲/۵۴٪ گزارش شده است (۵۰).

همچنین در مطالعه Mathur و همکاران که بر روی جدایه‌های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس انجام گرفت، پارامترهای حساسیت، ویژگی و دقت در روش CRA، به ترتیب ۶/۸٪، ۹۰/۲٪ و ۴۰/۹٪ بودند (۲۳).

Hassan و همکاران (۵۱)، حساسیت و ویژگی روش‌های CRA، TM، و TCP را جهت بررسی تشکیل بیوفیلم در جدایه‌های بالینی مورد مطالعه قرار دادند و در روش CRA، تنها ۱۰٪ از جدایه‌ها تولیدکننده بیوفیلم بودند. آنها حساسیت، ویژگی و دقت را به ترتیب ۱۱٪، ۹۲٪ و ۴۱٪ گزارش کردند و به این نتیجه رسیدند که روش CRA با روش‌های دیگر همبستگی خوبی ندارد.

با اینکه به گفته برخی از محققان سنجش CRA، نسبت به سایر روش‌ها آسان‌تر است. با این حال، برای شناسایی دقیق سویه‌های تولیدکننده بیوفیلم در آزمایشگاه‌های تشخیصی توصیه نمی‌شود زیرا می‌تواند نتایج مثبت یا منفی کاذب به همراه داشته باشد (۵۲، ۵۳).

همچنین، یزدانی و همکاران (۳۹)، ۵۰ جدایه بالینی استافیلوکوکوس اورئوس را جهت بررسی تشکیل بیوفیلم با روش CRA مورد ارزیابی قرار دادند و مشاهده نمودند که فقط ۵۴ درصد از آنها توانایی تولید بیوفیلم را داشتند اما تمامی ۵۰ جدایه مورد بررسی واجد ژن‌های icaAD بودند.

در پژوهش Arciola و همکاران (۴۲)، تعدادی از جدایه‌های CRA منفی، دارای ژن‌های ica بودند. نتایج مطالعه Fitzpatrick و همکاران (۵۴) نیز پایین بودن دقت این روش را نشان داده است.

در بررسی ما، در روش TM تعداد جدایه‌های تولیدکننده قوی، متوسط و ضعیف بیوفیلم به ترتیب ۱۳ (۳۲/۵٪)، ۱۴ (۳۵٪) و ۱۳ (۳۲/۵٪) بودند. مقایسه نتایج این روش با

توانایی تشکیل بیوفیلم بسیار قابل اعتماد است اما شواهدی وجود دارد که وجود ژنهای *ica* همیشه با تولید بیوفیلم مرتبط نیستند (۶۲).

در عین حال، در جدایه های *MRSA* تولید بیوفیلم مستقل از *ica* نیز توصیف شده است که اساساً تولید *eDNA* و پروتئینهای اتصالی سطحی در آن دخیل هستند (۲۱). در واقع، حذف لوکوس *icaADBC* (کد کننده *PIA*) در تعدادی از سویه های استافیلوکوکوس اورئوس در تولید بیوفیلم اختلالی ایجاد نخواهد کرد (۶۳).

### نتیجه گیری

در پژوهش حاضر، تمامی جدایه های تولیدکننده بیوفیلم برای ژن *icaD* مثبت بودند و در ۲۱ (۵۲/۵٪) جدایه، هر دو ژن *icaA* و *icaD* حضور داشتند که نشان دهنده ارتباط میان ژنهای *icaAD* و تولید بیوفیلم در جدایه های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس می باشد. همچنین نتایج نشان دادند که نوع محیط کشت می تواند بر میزان تشکیل بیوفیلم باکتریایی تاثیر داشته باشد، زیرا با اینکه هر سه روش کنگو رد آگار، لوله و صفحه کشت بافت در تشخیص جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس تولیدکننده بیوفیلم مؤثر بودند، اما آزمون *TCP* اصلاح شده نسبت به سایر روشهای فنوتیپی در مقایسه با آنالیز مولکولی، حساسیت، ویژگی و دقت بالاتری را نشان داد. بنابراین، روش کمی *TCP*، روشی مناسب و قابل تکرار برای شناسایی جدایه های تولیدکننده بیوفیلم در مجموعه های مراقبت های بهداشتی می باشد.

با در نظر گرفتن اینکه تشکیل بیوفیلم می تواند مشکلات زیادی را در زمینه های مختلف پزشکی به ویژه در مورد وسایل مصنوعی مانند ایمپلنت های ارتوپدی ایجاد نمایند، نتایج مطالعه ما، استفاده از روش فنوتیپی *TCP* اصلاح شده به همراه سنجش ژنوتیپی را برای غربالگری جدایه های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس تولید کننده بیوفیلم پیشنهاد می نماید.

سنجش توانایی تولید بیوفیلم در جدایه های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس ایده آل خواهد بود.

بررسی ها نشان داده اند که بیان ژنهای *ica*، متناسب با ترکیب محیط کشت بسیار متغیر است زیرا توسط تنش (استرس) با قندهای اضافی القاء می شود (۲۳).

در مطالعه حاضر، در سنجش *TCP* با محیط *TSB*، فقط ۱۲ (۳۰٪) جدایه از مجموع جدایه های مورد آزمایش فنوتیپ بیوفیلم مثبت را نشان دادند در حالیکه با افزودن ۱٪ گلوکز به محیط *TSB* تعداد جدایه های بیوفیلم مثبت به ۲۱ (۵۲/۵٪) افزایش یافت که با مشاهدات سایر محققین مطابقت دارد (۵۵،۵۹،۲۳).

همچنین، هنگامی که حضور ژنهای *icaAD* با نتایج *TCP* مقایسه شدند، با افزودن ۱٪ گلوکز به *TSB*، حساسیت، ویژگی و دقت آن نسبت به سنجش *TCP* فقط با محیط *TSB*، افزایش یافت که با مطالعه *Manandhar* و همکاران (۵۵) همسو است.

این شواهد نشان می دهد که تشکیل بیوفیلم در استافیلوکوکها، به شرایط رشد بستگی دارد و استفاده از شکر به عنوان مکمل در محیط های کشت برای تشکیل بیوفیلم ضروری است (۲۳).

استفاده از مقدار قند اضافی در یک محیط کشت باعث ایجاد یک شرایط تنش می شود که واکنش تخمیر را تحریک کرده و در نتیجه شرایط بی هوازی به نفع تولید *PIA* و افزایش تولید بیوفیلم خواهد بود (۶۰). در مجموع، نتایج نشان دادند که بیان ژنهای *ica* متغیر هستند و توسط عوامل متعددی از جمله مخلوط کردن قند، نمک و اتانول با محیط کشت القاء می شوند (۲۳،۵۴). در پژوهش حاضر، ژنهای *icaAD* در تعدادی از سویه ها که نتایج روشهای فنوتیپی در آنها منفی بود شناسایی شدند که با نتایج مطالعه *Manandhar* و همکاران (۵۵)، مطابقت دارد و اهمیت سنجش ژنوتیپی را نشان می دهد.

اگر چه بررسی های دیگری (۴۲،۶۱) نیز نشان داده اند که تشخیص ژنهای *ica* بوسیله روش *PCR*، برای تشخیص

## ملاحظات اخلاقی

این مطالعه با شناسه IR.IAU. TMU.REC.1397.308 به تصویب کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی تهران رسیده است.

## تعارض و منافع

نویسندگان مقاله اعلام می دارند که هیچ گونه تضادی در منافع وجود ندارد.

## منابع

- Kouidhi B, Zmantar T, Hentati H, Bakhrouf A. Cell surface hydrophobicity, biofilm formation, adhesives properties and molecular detection of adhesins genes in *S.aureus* associated to dental caries. *Microbial Pathogenesis* 2010; 49(1-2): 14–22.
- Thomsen IP, Dumont AL, James DBA, Yoong P, Saville BR, Soper N, et al. Children with invasive *S. aureus* disease exhibit a potently neutralizing antibody response to the cytotoxin LukAB. *Infection and Immunity* 2014; 82(3): 1234–42.
- Mandal SM, Ghosh AK, Pati BR. Dissemination of antibiotic resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant *S. aureus* strains isolated from hospital effluents. *American Journal of Infection Control* 2015; 43(12): 87–88.
- Brown AF, Leech JM, Rogers TR, McLoughlin RM. *Staphylococcus aureus* colonization: modulation of host immune response and impact on human vaccine design. *Frontiers in Immunology* 2014; 4: 507.
- Berthelot P, Grattard F, Cazorla C, Passot JP, Fayard JP, Meley R, et al. Is nasal carriage of *Staphylococcus aureus* the main acquisition pathway for surgical-site infection in orthopedic surgery? *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2010; 29: 373-382.
- Figueiredo AMS, Ferreira Antunes F, Ossaille Beltrame C, Farrel Côrtes M. The role of biofilms in persistent infections and factors involved in ica-independent biofilm development and gene regulation in *Staphylococcus aureus*. *Critical Reviews in Microbiology* 2017; 43: 602–620.
- Flemming HC, Wingender J, Szewzyk U, Steinberg P, Rice SA, Kjelleberg S. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology* 2016; 14(9): 563- 75.
- Olsen I. Biofilm-specific antibiotic tolerance and resistance. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2015; 34: 877–886.
- Jamal M, Ahmad W, Andleeb S, Jalil F, Imran M, Asif Nawaz M, et al. Bacterial biofilm and associated infections. *Journal of the Chinese Medical Association* 2018; 81(1): 7-11.
- Gotz F. *Staphylococcus* and biofilms. *Molecular Microbiology* 2002;43(6):1367–78.
- Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 2001; 358(9276): 135-8.
- Hamilton MA. Testing antimicrobials against biofilm bacteria. *Journal of AOAC international* 2002; 85(2): 479-85.
- Le KY, Park MD, Otto M. Immune evasion mechanisms of *Staphylococcus epidermidis* biofilm infection. *Frontiers in Microbiology* 2018; 9:359.
- Vestby LK, Grønseth T, Simm R, Nesse LL. Bacterial biofilm and its role in the pathogenesis of disease. *Antibiotics* 2020; 9(2): 59.
- Arciola CR, Campoccia D, Montanaro L. Implant infections: adhesion, biofilm formation and immune evasion. *Nature Reviews Microbiology* 2018; 16(7): 397–409.
- Darouiche RO. Device-associated infections: a macro problem that starts with micro adherence. *Clinical Infectious Diseases* 2001; 33(9):1567–72.
- Cherry JD, Yogeve R, Harrison GJ, Tan T, Kaplan SL, Steinbach WJ, et al. Infections related to prosthetic or artificial devices. In *Feigin, Cherry, Demmier and Kaplan: Textbook of Pediatric Diseases, 2013; 7th ed* (pp. 1015-1043). Elsevier Saunders.
- Namvar AE, Asghari B, Ezzatifar F, Azizi Gh, Rastegar Lari A. Detection of the intercellular adhesion gene cluster (ica) in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *GMS Hygiene and Infection Control* 2013; 8(1). doi: 10.3205/dgkh000203
- Arciola CR, Campoccia D, Ravaoli S, Montanaro S. Polysaccharide intercellular adhesion in biofilm: structural and regulatory

- aspects. *Frontiers in Cellular Infection Microbiology* 2015; 5:7
20. Cramton SE, Gerke C, Schnell N F, Nichols W W, Götz F. The intercellular adhesion (ica) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. *Infection and Immunity* 1999; 67(10): 5427–5433.
  21. McCarthy H, Rudkin JK, Black NS, Gallagher L, O'Neill E, O'Garra GP. Methicillin resistance and the biofilm phenotype in *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2015; 5: 1.
  22. Archer NK, Mazaitis MJ, Costerton JW, Leid JG, Powers ME, Shirtliff ME. *Staphylococcus aureus* biofilms. *Virulence* 2011; 2(5): 445–59.
  23. Mathur T, Singha S, Khan S, Upadhyay DJ, Fatma T, Rattan A. Detection of biofilm formation among the clinical isolates of staphylococci: An evaluation of three different screening methods. *Indian Journal of Medical Microbiology* 2006; 24(1): 25–9.
  24. Zalipour M, Sedigh Ebrahim-Saraieet H, Sarvaria J. Detection of biofilm production capability and *icaA/D* genes among staphylococci isolates from Shiraz, Iran, *Jundishapur Journal of Microbiology* 2016; 9(12): 41431.
  25. Mahon C, Lehman D. *Textbook of diagnostic microbiology-E-Book*. Maryland Heights: Elsevier Health Sciences; 2014. Hardcover ISBN: 9780323613170. eBook ISBN: 9780323482127
  26. CLSI Performance Standards for antimicrobial susceptibility testing, 29th edition. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory standard Institute; 2019. ISBN Number: 978-1-68440-033-1
  27. Choi SM, Kim SH, Kim HJ, Lee DG, Choi JH, Yoo JH, et al. Multiplex PCR for the Detection of Genes Encoding Aminoglycoside Modifying Enzymes and Methicillin Resistance among *Staphylococcus* Species. *Journal of Korean Medical Science* 2003; 18(5): 631-6.
  28. Arciola CR, Campoccia D, Montanaro L. Detection of biofilm-forming strains of *Staphylococcus epidermidis* and *S. aureus*. *Expert Review of Molecular Diagnostic* 2002; 2(5): 478–484.
  29. Halim RMA, Kassem NN, Mahmoud BS. Detection of biofilm producing staphylococci among different clinical isolates and its relation to methicillin susceptibility. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences* 2018; 6(8): 1335- 1341.
  30. Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, Baddour LM, Barrett FF, Melton DM, et al. Adherence of coagulase-negative Staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *Journal of Clinical Microbiology* 1985; 22(6): 996–1006.
  31. Kadurugamuwa JL, Sin L, Albert E, Yu J, Francis K, DeBoer M, et al. Direct continuous method for monitoring biofilm infection in a mouse model. *Infection and Immunity* 2003; 71(2): 882–890.
  32. Gad GFM, El-Feky MA, El-Rehewy MS, Amin Hassan M, Abolella H, Mahmoud Abd El-Baky R. Detection of *icaA*, *icaD* genes and biofilm production by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* isolated from urinary tract catheterized patients. *The Journal of Infection in Developing Countries* 2009; 3: 342-51.
  33. Foster TJ. Immune evasion by staphylococci. *Nature Reviews Microbiology* 2005; 3(12): 948–58.
  34. Edwards AM, Bowden MG, Brown EL, Laabei M, Massey RC. *Staphylococcus aureus* extracellular adherence protein triggers TNF alpha release, promoting attachment to endothelial cells via protein a. *PLoS One* 2012; 7(8): 43046.
  35. Tan X, Qin N, Wu Ch, Sheng J, Yang R, Zheng B, et al. Transcriptome analysis of the biofilm formed by methicillin susceptible *Staphylococcus aureus*. *Scientific Reports* 2015; 5: 11997.
  36. Piechota M, Kot B, Frankowska-Maciejewska A, Gruzewska A, Woźniak-Kosek A. Biofilm formation by methicillin-resistant and methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* strains from hospitalized patients in Poland. *BioMed Research International* 2018 : 4657396.
  37. Achek R, Hotzel H, Nabi I, Kechida S, Mami D, Didouh N, et al. Phenotypic and molecular detection of biofilm formation in *staphylococcus aureus* isolated from different sources in Algeria. *Pathogens* 2020; 9: 153.
  38. Kot B, Sytykiewicz H, Sprawka I. Expression of the biofilm-associated genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in biofilm and planktonic conditions. *International Journal of Molecular Science* 2018; 19(11): 3487.

39. Yazdani R, Oshaghi M, Havayi A, Pishva E, Salehi R, Sadeghzadeh M, et al. Detection of *icaAD* gene and biofilm formation in *Staphylococcus aureus* isolates from wound infections. *Iranian Journal of Public Health* 2006; 35(2): 25-28
40. Nguyen HTT, Nguyen ThH, Otto M. The staphylococcal exopolysaccharide PIA - Biosynthesis and role in biofilm formation, colonization, and infection. *Computational and Structural Biotechnology Journal* 2020; 18: 3324-3334.
41. Ghaderi H, Malekabad E Sh, Vahidi M, Dadashi AR. Evaluation of genotypic and phenotypic biofilm formation by *Staphylococcus aureus* isolated from clinical samples and their association with antimicrobial resistance. *Iranian Journal of Medical Microbiology* 2020; 14(5):441-459 .
42. Arciola CR, Baldassarri L, Montanaro L. Presence of *icaA* and *icaD* genes and slime production in a collection of staphylococcal strains from catheter-associated infections. *Journal of Clinical Microbiology* 2001; 39(6): 2151-6.
43. Rohde H, Knobloch JK, Horstkotte MA, Macket D. Correlation of *Staphylococcus aureus* *icaADBC* genotype and biofilm expression phenotype. *Journal of Clinical Microbiology* 2001; 39(12): 4595-4596.
44. Diamond-Hernández B, Solórzano-Santos F, Leñanos-Miranda B, Peregrino-Bejarano L, Miranda-Novales G. Production of *icaADBC*-encoded polysaccharide intercellular adhesin and therapeutic failure in pediatric patients with staphylococcal device-related infections. *BMC Infectious Diseases* 2010; 15(10): 68.
45. Bazari PAM, Honarmand Jahromy S, Zare Karizi Sh. Phenotypic and genotypic characterization of biofilm formation among *Staphylococcus aureus* isolates from clinical specimens. an Atomic Force Microscopic (AFM) study. *Microbial Pathogenesis* 2017; 110: 533-539.
46. Grinholc M, Wegrzyn G, Kurlenda J. Evaluation of biofilm production and prevalence of the *icaD* gene in methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients with nosocomial infections and carriers. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 2007; 50(3): 375-379.
47. Bimanand L, Taherikalani M, Azizi Jalilian F, Sadeghifard N, Ghafourian S, Mahdavi Z, et al. Association between biofilm production, adhesion genes and drugs resistance in different SCCmec types of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from several major hospitals of Iran. *Iranian Journal of Basic Medical Science* 2018; 21(4): 400-403.
48. Mohamadian M, Sadeghifard N, Ghafourian S, Pakzad I. Biofilm formation in Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*. *Gene Reports* 2020; 21: 100923.
49. Azmi, K, Qrei W, Abdeen Z. Screening of genes encoding adhesion factors and biofilm production in methicillin resistant strains of *Staphylococcus aureus* isolated from Palestinian patients *BMC Genomics* 2019; 20: 578.
50. John NP, Murugan S. Biofilm Formation by Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* and their Antibiotic Susceptibility Pattern: An in vitro Study. *Current Research in Bacteriology* 2014; 7: 1-11.
51. Hassan A, Usman J, Kaleem F, Omair M, Khalid A, Iqbal M. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. *Brazilian Journal of Infectious Diseases* 2011; 15: 303-311.
52. Oliveira A, Cunha MDL. Comparison of methods for the detection of biofilm production in coagulase-negative staphylococci. *BMC Research Notes*. 2010; 3: 1-8.
53. Knobloch JK, Horstkotte MA, Rohde H, Mack D. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Medical Microbiology and Immunology*. 2002; 191(2): 101-6.
54. Fitzpatrick F, Humphreys H, O'Gara JP. The genetics of staphylococcal biofilm formation—will a greater understanding of pathogenesis lead to better management of device-related infection? *Clinical Microbiology and Infection*. 2005; 11(12): 967-73.
55. Manandhar S, Singh A, Varma A, Pandey Sh, Shrivastava N. Evaluation of methods to detect in vitro biofilm formation by staphylococcal clinical isolates. *BMC Reserch Notes*. 2018; 11(1): 714.
56. Saha R, et al. Detection of biofilm formation in urinary isolates: need of the hour. *Journal of Research in Biology* 2004; 4(1):1174-1181.
57. Taj, Y, Essa F, Aziz F, Kazmi ShU. Study on biofilm-forming properties of clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Infection in Developing Countries* 2012; 6(5): 403-409.

58. Abdel Halim RM, Kassem NN, Mahmoud BS. Detection of Biofilm Producing Staphylococci among Different Clinical Isolates and Its Relation to Methicillin Susceptibility. Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences. 2018; 6(8):1335-1341.
59. Johannes KM, Horstkotte MA, Rohde H, Mack D. Evaluation of different methods of biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. Medical Microbiology and Immunology 2002; 191:101-106.
60. Arciola CR, Campoccia D, Baldassarri L, Donati ME, Pirini V, Gamberini S, Montanaro L. Detection of biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* from implant infections Comparison of a PCR-method that recognizes the presence of *ica* genes with two classic phenotypic methods. Journal of Biomedical Material Research. 2006;76(2):425-30.
61. O’Gara JP. *ica* and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. FEMS Microbiology Letters 2007; 270(2): 179-88.
62. Nasr RA, AbuShady HM, Hussein HS. Biofilm formation and presence of *icaAD* gene in clinical isolates of staphylococci. Egyptian Journal of Medical human Genetics 2012; 13(3): 269-274.
63. Moormeier DE, Bose JL, Horswill AR, Bayles KW . Temporal and stochastic control of *Staphylococcus aureus* biofilm development. American Society for Microbiology, mBio 2014; 5(5): 01341-14.