

Antibiotic resistance pattern and biofilm production in *Staphylococcus aureus* isolates and *Staphylococcus epidermidis* isolated from hospital infections Tehran in 2016

Sina Mashaiekh¹, Kumarss Amini²

Background and Aim: *Staphylococci* are common pathogens of humans and livestock that able to produce a wide range of diseases. *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* are the important factors for biofilm production in patients. This study was designed to determine the ability of biofilm production and the resistance pattern of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* strains that isolated from hospital and food infectious.

Materials and Methods: This descriptive cross-sectional study was performed on 117 hospital samples. First, biochemical tests were used in order to isolate and confirm *Staphylococcus epidermidis* and *aureus* strains. To determine biofilm production, the Microtiter plate method was applied and the presence of *icaA* and *icaD* genes are were identified using PCR. Antibiotic resistance pattern of strains was evaluated by Disk diffusion method related to 7 antibiotics.

Results: 12 strains of *Staphylococcus epidermidis* and 20 strains of *Staphylococcus aureus* were isolated from 117 hospital samples by biochemical tests, of these, 6 strains of the *Staphylococcus epidermidis* and 16 strains of the *Staphylococcus aureus* were the producers of biofilm. PCR results shown that *icaA* and *icaD* genes were present in 15 strains of *Staphylococcus aureus* and 6 strains of the *Staphylococcus epidermidis*. The highest antibiotic resistance in the antibiotic resistance test was related to penicillin, gentamicin, and amikacin respectively.

Conclusion: Extending clinical samples of biofilm producers with multiple antibiotic resistance can be considered as a serious risk for patients and lead to increase mortality rate in hospitals.

Key Words: *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, Biofilm, Antibiotic Resistance

Journal of Birjand University of Medical Sciences. 2018; 25(2): 160-166.

Received: June 24, 2017 Accepted: June 11, 2018

¹ Department of Microbiology, Sirjan Branch Islamic Azad University, Sirjan, Iran.

² **Corresponding Author;** Department of Microbiology, Faculty of basic science, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran.
Tel: 09125454074 Fax: 021-44850954 Email: dr_kumarss_amini@yahoo.com

مقدمه

icaA و *icaD* نقش بیشتری در تشکیل بیوفیلم در استافیلوکوکوس اورئوس و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس بازی می‌کنند (۲، ۴).

با توجه به شیوع بسیار بالای عفونت‌های بیمارستانی ناشی از استافیلوکوکوس‌ها و همچنین گسترش عوامل افزایش‌دهنده مقاومت آنتی‌بیوتیکی، این مطالعه با هدف بررسی توان تشکیل بیوفیلم و تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی این سویه‌ها به انجام رسید.

روش تحقیق

این مطالعه توصیفی-مقطعی با کد اخلاق IR. 1396. IAUC. 332127630 در دانشگاه آزاد اسلامی واحد سیرجان انجام گردید. نمونه‌های بالینی از سه بیمارستان آموزشی تهران (امام خمینی، شریعتی و مرکز طبی اطفال) در یک بازه زمانی ۶ماهه از ابتدای اردیبهشت تا پایان مهر ۱۳۹۵ جمع‌آوری شد. نمونه‌ها شامل: خون، ادرار، چرک، زخم، مایع مغزی نخاعی، خلط و آسه بود. پس از انتقال نمونه‌ها بر روی محیط آگار خون‌دار (شرکت مرک، آلمان) به آزمایشگاه تحقیقاتی پاسارگاد (واقع در تهران)، تمامی نمونه‌ها با استفاده از تست‌های استاندارد میکروبیولوژیکی و بیوشیمیایی تعیین هویت شدند.

حساسیت آنتی‌بیوتیکی بر روی محیط مولر هینتون آگار و با استفاده از روش انتشار از دیسک برای آنتی‌بیوتیک‌های اگزاسیلین (۱μg)، سیپروفلوکساسین (۵μg)، پنی‌سیلین (۱۰μg)، اریترومایسین (۱۵μg)، تتراسایکلین (۳۰μg)، آمیکاسین (۳۰μg) و جنتامایسین (۱۰μg) بر اساس دستورالعمل استاندارد آزمایشگاه و بالین (۵) و با استفاده از روش انتشار از ژل، پس از تهیه غلظت نیم مک‌فارلند، بر روی محیط مولر هینتون آگار انجام شد. سوسپانسیون تهیه‌شده به‌وسیله سوآپ استریل پنبه‌ای، روی محیط مولر هینتون آگار به‌صورت متراکم کشت داده شد؛ سپس دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی با پنس استریل در سطح محیط قرار گرفته و

استافیلوکوکوس‌ها در طبیعت انتشار وسیعی داشته و غالباً به‌عنوان میکروفلور در انسان و حیوانات مطرح هستند. این باکتری‌ها می‌توانند به‌صورت اجتماع بیوفیلم در سطح کاترها و سوندهای ادراری رشد کنند و مقاومت فوق‌العاده‌ای نسبت به عوامل ضد میکروبی از خود نشان می‌دهند (۱). بیوفیلم، ساختاری متشکل از یک جمعیت باکتریایی است که به‌وسیله یک ماتریکس اگزوپولی‌ساکاریدی تولیدشده توسط باکتری، محصور شده است. این ویژگی به باکتری توانایی اتصال به سطوح مختلف و همچنین افزایش مقاومت ذاتی به آنتی‌بیوتیک‌ها را می‌دهد (۲). از میان تمامی اعضای خانواده استافیلوکوکاسیه، استافیلوکوکوس اورئوس و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس به‌عنوان مهم‌ترین پاتوژن‌ها مطرح هستند و از عوامل مهم بروز عفونت بیمارستانی محسوب می‌شوند. این باکتری‌ها به‌واسطه تشکیل بیوفیلم، توانایی اتصال به سطوح مختلف از قبیل ونتیلاتورهای مکانیکی، کاتتر و بافت میزبان را دارا هستند (۳). از طرف دیگر تشکیل بیوفیلم منجر به ایجاد عفونت‌های مقاوم به درمان می‌شود که در نتیجه سبب افزایش هزینه‌های ناشی از درمان، شکست درمانی و عود عفونت می‌گردند. تخمین زده می‌شود که ۶۵ درصد از عفونت‌های بیمارستانی در ایالات‌متحده، با تشکیل بیوفیلم‌ها در ارتباط بوده و خسارات اقتصادی ناشی از بیوفیلم‌ها سالیانه بیش از یک میلیارد دلار هزینه دربر دارد (۴).

در این ارگانیس‌ها، تولید بیوفیلم ناشی از فعالیت اپرونی تحت عنوان *icaABCD* می‌باشد که مهم‌ترین عامل برای تشکیل ماتریکس اگزوپولی‌ساکاریدی و از عوامل چسبندگی بین سلولی^۱ PIA است (۳). ژن‌های *icaC* *icaB* *icaA* و *icaD* توسط سیستم‌های تنظیمی متعددی کنترل می‌شوند. این سیستم‌های تنظیمی شامل *SarA* و سیگما B است. علاوه بر سیستم اپرون *icaABCD*، سیستم *agr* نیز در ایجاد بیوفیلم نقش دارد (۴). از میان ژن‌های لوکوس *ica*

¹ Polysaccharide Intercellular Adhesin

DNA ژنومی باکتریایی با استفاده از دستورالعمل کیت استخراج سیناژن (Cinna Pure DNA KIT-PR881613) (البرز، ایران) به دست آمد و درجه خلوص محصول استخراج شده در طول موج ۲۶۰ نانومتر، با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر تأیید شد.

تست M-PCR برای شناسایی ژن‌های کدکننده بیوفیلم *icaA* و *icaD* با استفاده از توالی‌های الیگونوکلئوتیدی پرایمرهای اختصاصی شامل: $icaA-F:5'-ACACTTGCTGGCGCAGTCAA-3'$ و $icaA-R:5'-TCTGGAACCAACATCCAACA-3'$ و $icaD-F:5'-ATGGTCAAGCCCAGACAGAG-3'$ و $icaD-R:5'-AGTATTAATGTTTAAAGCAA-3'$ در دستگاه ترمال سایکلر (اپندورف، آلمان) در حجم ۲۵ میکرولیترو هر واکنش شامل ۲۰۰ میکرومول dNTP، ۱۰ پیکومول از هر پرایمر، ۱/۵ میلی‌مول در لیتر $MgCl_2$ ، ۵/۰ واحد آنزیم Taq و ۵۰ نانوگرم DNA الگو انجام گردید. به منظور حصول اطمینان از عملکرد پرایمرها، توالی‌های الیگونوکلئوتیدی پرایمرها در سایت NCBI، BLAST شد و این گونه صحت توالی‌های مورد استفاده تأیید گردید. شرایط دمایی در این واکنش شامل یک سیکل ۱۰ دقیقه‌ای در ۹۵ درجه سلسیوس (دنا تورا سیون اولیه)، سپس ۳۲ سیکل شامل: مرحله واسرشت شدن ۶۰ ثانیه در ۹۴ درجه سلسیوس، مرحله اتصال ۶۰ ثانیه در ۵۸ درجه سلسیوس و مرحله طولی شدن یک دقیقه در ۷۲ درجه سلسیوس و در نهایت یک سیکل ۱۰ دقیقه‌ای در ۷۲ درجه سلسیوس بود. محصولات تکثیر یافته از نظر حضور ژن‌های مورد نظر، با انجام الکتروفورز بر روی ژل آگارز یک درصد و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید بررسی شدند.

یافته‌ها

در این مطالعه تعداد ۱۱۷ نمونه از بالین، از سه بیمارستان آموزشی تهران جمع‌آوری گردید که از این تعداد ۲۰ مورد

محیط کشت به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرار داده شد. در نهایت قطر هاله عدم رشد به وسیله کولیس اندازه‌گیری گردید. در این مطالعه *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC ۲۵۹۲۳ و *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* ATCC ۱۲۲۲۸ به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

توانایی تشکیل بیوفیلم در جدایه‌های مورد بررسی، با روش میکروتیتر پلیت انجام شد. در این روش جدایه‌ها پس از کشت در محیط TSB حاوی ۰/۵ درصد گلوکز، یک شبانه‌روز در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. بعد از خالی کردن محتویات چاهک‌ها و شستشوی آنها با PBS، میکروپلیت‌ها به طور کامل در معرض هوا خشک گردیدند. در محله بعد رنگ آمیزی با استفاده از کریستال ویوله یک درصد انجام شد. سپس رنگ موجود در هر چاهک با استفاده از آب معمولی شستشو داده شد و برای آزادسازی رنگ موجود در دیواره باکتری‌هایی که مولد بیوفیلم می‌باشند، ۱۰۰ میکرولیتر ایزوپروپیل الکل ۱۰ درصد به علاوه اتانول ۷۰ درصد به هر چاهک اضافه گردید. در نهایت رنگ آزاد شده در هر چاهک در طول موج نوری ۵۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه الیزا بررسی شد. از محیط TSB حاوی یک درصد گلوکز به عنوان کنترل منفی در این روش استفاده گردید. برای اطمینان از صحت کار، برای ایزوله‌های مورد مطالعه ۳ مرتبه جذب نوری هر یک از ایزوله‌ها، مورد بررسی قرار گرفت. روش محاسبه مقدار تولید بیوفیلم برای هر گروه در جدول یک ارائه شده است.

جدول ۱- طبقه‌بندی تشکیل بیوفیلم به وسیله روش میکروتیتر پلیت

نتایج حاصل از میانگین حداکثر جذب نوری (OD)	محاسبه میزان حد نصاب	توانایی تشکیل بیوفیلم
OD > 0.332	OD > 4 * ODC ²	قوی
0.166 < OD <= 0.332	2 * ODC < OD <= 4 * ODC	متوسط
0.083 < OD <= 0.166	OD < OD <= 2 * ODC	ضعیف
OD <= 0.083	OD <= 0.083	عدم اتصال

OD: چگالی نوری؛ ODC: میزان چگالی نوری کنترل مثبت است که قادر به تولید بیوفیلم می‌باشد (کنترل منفی 3*SD) + (میانگین کنترل منفی ODC:OD)

استافیلوکوکوس اورئوس، ۱۶ ایزوله (۸۰٪) مؤلفه بیوفیلم بودند که از این تعداد ۱۲ ایزوله توانایی اتصال قوی، ۳ ایزوله توانایی اتصال متوسط و یک ایزوله توانایی اتصال ضعیف را داشتند. از مجموع ۱۲ ایزوله استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، ۶ (۵۰٪) ایزوله مؤلفه بیوفیلم بودند که از این تعداد ۳ ایزوله توانایی اتصال قوی، ۲ ایزوله توانایی اتصال متوسط و یک ایزوله توانایی اتصال ضعیف را داشتند.

نتایج حاصل از آزمون مولکولی نشان داد که از مجموع تمامی استافیلوکوکوس اورئوس تحت مطالعه، ۱۵ ایزوله واجد هر دو ژن *icaA* و *icaD* بودند. همچنین فراوانی ۵۰ درصد از استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس واجد هر دو ژن *icaA* و *icaD* و یک ایزوله واجد ژن *icaD* بود (شکل ۱).

استافیلوکوکوس اورئوس (۱۷/۰۹٪) و ۱۲ مورد استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس (۱۰/۲۵٪) بود. جزئیات نمونه‌ها به تفکیک محل اخذ نمونه و تعداد آن، در جدول ۲ ارائه شده است. بیشترین و کمترین تعداد استافیلوکوکوس اورئوس و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، از نمونه‌های زخم و مایع مغزی-نخاعی به دست آمدند. در این مطالعه، هیچ موردی از خلط جدا نشد. همچنین استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس از نمونه CSF به دست نیامد.

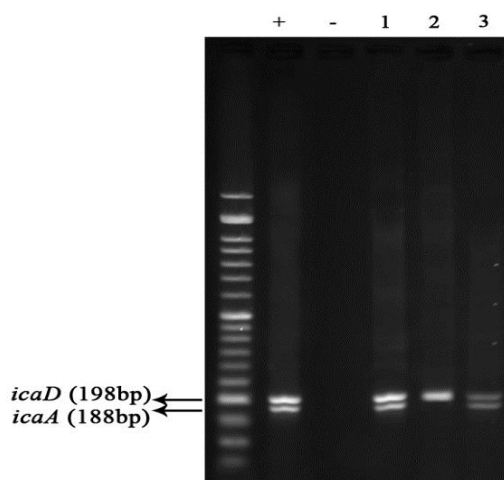
نتایج نشان داد که بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی و حساسیت به ترتیب مربوط به پنی‌سیلین، اریترومایسین و آمیکاسین بود. روش میکروتیتر پلیت بر اساس اندازه‌گیری جذب نوری نشان داد که از تعداد کل ۲۰ ایزوله

جدول ۲- فراوانی استافیلوکوکوس اورئوس و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس جدا شده به تفکیک نوع نمونه‌ها

نوع نمونه	تعداد کل	استافیلوکوکوس اورئوس	استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس
خون	۲۱	۴ (۱۹/۰۴٪)	۱۷ (۸۱/۵۲٪)
زخم	۳۵	۶ (۱۷/۱۴٪)	۲۹ (۸۲/۸۶٪)
ادرار	۱۵	۳ (۲۰٪)	۱۲ (۸۰٪)
چرک	۱۵	۲ (۱۳/۳۳٪)	۱۳ (۸۶/۶۶٪)
خلط	۷	-	-
CSF	۵	۱ (۲۰٪)	-
آبسه	۱۹	۴ (۲۱/۰۵٪)	۱۵ (۷۸/۷۸٪)
جمع کل	۱۱۷	۲۰ (۱۷/۰۹٪)	۹۷ (۸۳/۹۰٪)

جدول ۳- نتایج سنجش حساسیت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس و اپیدرمیدیس

آنتی‌بیوتیک	حساس		نیمه حساس		مقاوم
	استافیلوکوکوس اورئوس	استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس	استافیلوکوکوس اورئوس	استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس	
پنی‌سیلین	-	-	-	۲ (۶/۲۵٪)	۱۰ (۳۱/۲۵٪)
اگزاسیلین	۴ (۱۲/۵٪)	۴ (۱۲/۵٪)	۳ (۹/۳۸٪)	-	۸ (۲۵٪)
جنتامیسین	۹ (۲۸/۱۳٪)	۳ (۹/۳۸٪)	۷ (۲۱/۸۸٪)	۵ (۱۵/۶۳٪)	۴ (۱۲/۵٪)
تتراسایکلین	۷ (۲۱/۸۸٪)	۲ (۶/۲۵٪)	۵ (۱۵/۶۳٪)	۵ (۱۵/۶۳٪)	۵ (۱۵/۶۳٪)
اریترومایسین	۲ (۶/۲۵٪)	-	۹ (۲۸/۱۳٪)	۲ (۶/۲۵٪)	۹ (۲۸/۱۳٪)
سیپروفلوکساسین	۶ (۱۸/۷۵٪)	۵ (۱۵/۶۳٪)	۸ (۲۵٪)	۴ (۱۲/۵٪)	۶ (۱۸/۷۵٪)
آمیکاسین	۹ (۲۸/۱۳٪)	۳ (۹/۳۸٪)	۸ (۲۵٪)	۷ (۲۱/۸۸٪)	۲ (۶/۲۵٪)



شکل ۱- نتایج ژل الکتروفورز محصولات PCR ژن *icaD* و *icaA* به همراه کنترل مثبت استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس ATCC 12228، کنترل منفی آب مقطر. چاهک ۱؛ استافیلوکوکوس اورئوس، چاهک ۲ و ۳، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس

بحث

حاضر، به طور مجدد شاهد شیوع بالای استافیلوکوکوس های مولد بیوفیلم هستیم (۷). در مطالعه Iorio و همکاران در سال ۲۰۱۱، از میان ۴۷ جدایه استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از خون، ۲۵ جدایه در آزمایش تشخیص فنوتیپی بیوفیلم، از نظر تولید بیوفیلم مثبت بود؛ اما در مقایسه با نتایج پژوهش حاضر تفاوت زیادی را نشان داد که می تواند به دلیل متفاوت بودن منبع و نیز جغرافیای نمونه باشد (۸). در مطالعه Gad و همکاران در سال ۲۰۰۹ نشان داده شد که از ۱۸ جدایه استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از سوندهای ادراری انسان، ۱۵ جدایه (۸۳٪) تشکیل بیوفیلم دادند و از این تعداد ۵۳ درصد بیوفیلم قوی، ۲۳ درصد بیوفیلم متوسط و ۷ درصد بیوفیلم تشکیل ندادند. نتایج مطالعه Gad و همکاران نیز مشابه نتایج پژوهش حاضر، بیانگر توانایی بسیار بالای جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس در تولید بیوفیلم می باشد (۳).

در مطالعه حاضر تمامی سویه های مولد بیوفیلم، دارای هر دو ژن *icaA* و *icaD* بودند. این یافته برخلاف برخی گزارش ها از آسیا و اروپا است که در آن ها انطباق کامل میان تشکیل بیوفیلم به روش های کمی و کیفی و ژنوتایپ آنها یافت نشده است (۲، ۹)؛ اما در برخی از گزارش ها، هر دو ژن *icaD* و *icaA* در میان ۱۰۰ درصد سویه های مولد بیوفیلم

توانایی استافیلوکوکوس ها در تشکیل بیوفیلم ها، به زنده ماندن باکتری در محیط میزبان کمک می کند. امروزه بیوفیلم به عنوان یکی از دلایل مزمن شدن عفونت های استافیلوکوکی هم در پزشکی و هم در دامپزشکی مطرح شده است. پوشش آگزوپلی ساکارییدی محصور کننده بیوفیلم، سبب عبور آنتی بیوتیک ها به درون ماتریکس بیوفیلم و در نتیجه بروز مقاومت می گردد (۳).

در مطالعه ای که در سال ۲۰۰۹ در کشور هلند توسط Croes همکاران انجام گرفت، علاوه بر تأکید در مورد گسترش مقاومت های چندگانه در نمونه های عفونی، بر توانایی تولید بیوفیلم در ۶۰ درصد از ایزوله های استافیلوکوکوس اشاره شده است که به طور تقریبی مشابه نتایج حاصل از مطالعه حاضر می باشد که علاوه بر تأکید بر تولید بیوفیلم، بر افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی در نمونه های عفونی نیز اشاره دارد (۹). در مطالعه دیگری که توسط Namvar و همکاران در سال ۲۰۱۳ انجام گردید، از ۶۰ جدایه استافیلوکوکوس اورئوس، با استفاده از روش های میکروپلیت تیتراسیون و کشت بر محیط کنگو رد آگار، ۶۵ درصد از ایزوله ها مولد بیوفیلم قوی بودند که مشابه نتایج پژوهش

گزارش شده‌اند (۳، ۱۰). یافته‌های پژوهش حاضر مؤید اهمیت ژن‌های *icaA* و *icaD* در تشکیل بیوفیلم در استافیلوکوکوس اورئوس است که منطبق بر یافته‌های مطالعات Gad و همکاران و Arciola و همکاران است (۳، ۶).
چندگانه اهمیت ویژه‌ای داشته باشد. گسترش ایزوله‌های باکتریایی تولیدکننده بیوفیلم با مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی چندگانه که در این پژوهش شاهد آن بودیم، می‌تواند به‌عنوان خطر جدی برای بیماران محسوب شده و باعث افزایش موارد مرگ و میر در بیمارستان‌ها گردد.

نتیجه‌گیری

تقدیر و تشکر

استافیلوکوکوس اورئوس، از جمله باکتری‌هایی است که در بخش‌های مراقبت‌های ویژه بیمارستان به‌دلیل تولید بیوفیلم از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. با توجه به افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی در این باکتری و نیز توانایی بالای آن در تشکیل بیوفیلم، این باکتری می‌تواند در پیدایش عفونت‌های مزمن و همچنین ایجاد سویه‌های آنتی‌بیوتیکی

بدین‌وسیله از تمامی کارکنان بیمارستان‌های امام خمینی، شریعتی و مرکز طبی اطفال که ما را در جمع‌آوری نمونه‌های این پژوهش حاضر یاری رساندند و همچنین از کارکنان و پرسنل آزمایشگاه تحقیقاتی پاسارگاد، تقدیر و تشکر می‌گردد.

منابع:

- 1- Vázquez-Sánchez D, Rodríguez-López P. Biofilm Formation of Staphylococcus aureus. In: Fetsch A. Staphylococcus aureus. London(United Kingdom): Elsevier – Academic Press; 2018. pp: 87-103.
- 2- Petrelli D, Repetto A, D'Ercole S, Rombini S, Ripa S, Prenna M, et al. Analysis of meticillin-susceptible and meticillin-resistant biofilm-forming Staphylococcus aureus from catheter infections isolated in a large Italian hospital. J Med Microbiol. 2008; 57(3): 364–72.
- 3- Gad GF, El-Feky MA, El-Rehewy MS, Hassan MA, Abolella H, El-Baky RM. Detection of *icaA*, *icaD* genes and biofilm production by Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis isolated from urinary tract catheterized patients. J Infect Dev Ctries. 2009;3(5):342–51.
- 4- de Silva GD, Kantzanou M, Justice A, Massey RC, Wilkinson AR, Day NP, et al. The *ica* Operon and Biofilm Production in Coagulase-Negative Staphylococci Associated with Carriage and Disease in a Neonatal Intensive Care Unit. J Clin Microbiol. 2002 18; 40(2): 382–8.
- 5- CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 27th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017.
- 6- 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. J Clin Microbiol. 2001; 39(6): 2151–6.
- 7- Namvar AE, Asghari B, Ezzatifar F, Azizi GR. Detection of the intercellular adhesion gene cluster (*ica*) in clinical Staphylococcus aureus isolates. GMS Hyg Infect Control. 2013; 8(1): Doc03.
- 8- Iorio NLP, Lopes AP da CN, Schuenck RP, Barcellos AG, Olendzki AN, Lopez GL, et al. A combination of methods to evaluate biofilm production may help to determine the clinical relevance of Staphylococcus in blood cultures. Microbiol Immunol. 2011; 55(1): 28–33.
- 9- Croes S, Deurenberg RH, Boumans ML, Beisser PS, Neef C, Stobberingh EE. Staphylococcus aureus biofilm formation at the physiologic glucose concentration depends on the S. aureus lineage. BMC Microbiol. 2009; 9: 229.
- 10- Mirzaee M, Peerayeh SN, Ghasemian AM. Detection of *icaABCD* genes and biofilm formation in clinical isolates of methicillin resistant Staphylococcus aureus. Iran J Pathol. 2014; 9(4): 257–62. [Persian]