

# Evaluation of Genotypic and Phenotypic Biofilm Formation by *Staphylococcus aureus* Isolated from Clinical Samples and Their Association with Antimicrobial Resistance

Hossein Ghaderi<sup>1</sup>, Ebadallah Shiri Malekabad<sup>2</sup>, Mahmoud Vahidi<sup>3</sup>, Ali-Reza Dadashi<sup>\*4</sup>

1. Department of Bacteriology, School of Veterinary Science, Shiraz University, Shiraz, Iran.
2. Department of Biostatistics, AJA University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
3. Department of Medical Laboratory Sciences, School of Allied Medical Sciences, AJA University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
4. Infectious Disease Department, AJA University of Medical Sciences, Tehran, Iran

 [10.30699/ijmm.14.5.441](https://doi.org/10.30699/ijmm.14.5.441)



## ABSTRACT

**Background:** *Staphylococcus aureus* is one of the most important bacteria causes nosocomial infections, which by the biofilm formation can be effective in the creation of chronic diseases, and the creation and strengthening of drug resistance. The present study aimed to evaluate the genotypic and phenotypic biofilm formation by *S. aureus* isolated from clinical samples and their association with antimicrobial resistance.

**Materials & Methods:** In this descriptive cross-sectional study from Dec 2019 to Sep 2019, 200 clinical samples were obtained from AJA hospitals in Tehran. All samples were analyzed using blood agar, Baird-Parker Agar, mannitol salt agar and catalase, OF and coagulase assays. Antimicrobial resistance pattern of isolates was determined by the disc diffusion method. Multiplex PCR method was used to identify biofilm formation genes, includes *icaA*, *icaB*, *icaC*, and *icaD* genes. Data analyzed using SPSS 20 and the X<sup>2</sup> test.

**Results:** Out of 200 cultivated samples, 83 (41.5%) cases were confirmed as *S. aureus*. The highest resistance was observed to Penicillin (94%), Tetracycline (72%), Ampicillin (54%), and Cefoxitin (51%), respectively. Phenotypic biofilm formation ability reported in 65% of isolates. The frequency of presence of *icaA*, *icaB*, *icaC*, and *icaD* genes was estimated at 67.4%, 60.2%, 61.4%, and 62.6%, respectively. Eighty-seven percent of biofilm producing strains were multidrug-resistant, while all the biofilm negative strains were non- multiple drug resistance ( $P < 0/05$ ).

**Conclusion:** According to the results, Biofilm-positive strains have a very high propensity to demonstrate antimicrobial resistance, multidrug resistance and resistance to methicillin.

**Keywords:** *Staphylococcus aureus*, Biofilm, Antimicrobial Resistance, MRSA

Received: 2020/05/14; Accepted: 2020/08/31; Published Online: 2020/09/26

**Corresponding Information:** Ali-Reza Dadashi, Infectious Disease Department, AJA University of Medical Sciences, Tehran, Iran.  
Email: [drdadashialireza@gmail.com](mailto:drdadashialireza@gmail.com)



Copyright © 2020, This is an original open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribution of the material just in noncommercial usages with proper citation.

Use your device to scan and read the article online



Ghaderi H, Shiri Malekabad E, Vahidi M, Dadashi A. Evaluation of genotypic and phenotypic biofilm formation by *Staphylococcus aureus* isolated from clinical samples and their association with antimicrobial resistance. Iran J Med Microbiol. 2020; 14 (5) :441-459

Download citation: [BibTeX](#) | [RIS](#) | [EndNote](#) | [Medlars](#) | [ProCite](#) | [Reference Manager](#) | [RefWorks](#)

Send citation to:  [Mendeley](#)  [Zotero](#)  [RefWorks](#)

## Introduction

Biofilm is the aggregation of bacteria embedded in an extracellular matrix that can create on both abiotic and biotic surfaces (1). This layer provides ideal

conditions for bacteria to grow in unstable environments. The most important features of biofilm are bacterial survival in extreme environmental

conditions, role in pathogenicity and creating chronic diseases, strengthening drug resistance through antibiotic impermeability in the polymeric matrix, facilitate gene transfer through conjugation and increase genetic mutations due to these bacterial connections, development of new genotypic strains by mutation within the biofilm and activation of genes that they are responsible for bacterial virulence (2, 3). *S. aureus* is one of the pathogens that can cause disease in humans and animals (4). This bacterium is the cause of many diseases in humans, included skin infections, acute and invasive infections such as pneumonia, soft tissue and bone infections, heart valve infections and lethal sepsis. It is one of the most important causes of bacteremia and is responsible for 20-40% of deaths (5, 6). In addition to resistance, this bacterium has the ability to produce various pathogenic factors such as toxins, surface antigens, extracellular enzymes and biofilm production (6, 7).

In *S. aureus*, the pathogenicity of the biofilm is very important. The presence of this layer is encoded by a structural operon called intra cellular adhesin (*ica*), which has different gene locus including *icaA*, *icaD*, *icaB* and *icaC* (8,9, 10). The *icaA* gene is a primary inducer for start biofilm production. It is activated by the presence of UDP-N-acetyl glucosamine and is the only *ica* gene that has transferase properties. The *IcaD* protein is a messenger (chaperone) for other genes in this locus that helps the *icaA* gene, activates certain enzymes to express the *icaC* and *icaD* genes. When the *icaA* and *icaD* genes start cooperation, biofilm production increases 20 times (9, 10). The *icaC* gene communicates between the inside and outside of the bacterial cytoplasmic membrane, that it communicates the *IcaD* on the inside of the cytoplasmic membrane to the *IcaB* on the outside. The *IcaB* is the extracellular protein and cause the superficial association of the bacterium with intercellular adhesion polysaccharide (IAP). One of the factors that increases the expression of this operon is the relationship between *IcaB* and IPA, that more correlation leads to more biofilm production (11).

Biofilms in hospital environments, that are considered as a reservoir of infection transmission, responsible for causing 65% of nosocomial infections (12). Biofilm binds bacteria to surfaces and other hospital instruments and in this way, to provide the ground for infection in hospitalized people and users of these medical devices (13). In order to prevent the formation of biofilm and subsequent microbial resistance, increased hospitalization, increased costs, and increased mortality (especially in antibiotic-resistant *S. aureus*); proper use of antibiotics (under the supervision) as well as arbitrarily use of drugs and antimicrobial compounds, regular evaluation of resistance and expression of related genes at the hospital can greatly reduce the incidence of these problems.

Due to the high prevalence of nosocomial infections caused by *S. aureus* and also the spread of factors that increase antibiotic resistance, the present study aimed to evaluate the genotypic and phenotypic biofilm formation by *S. aureus* isolated from clinical samples and their association with antimicrobial resistance.

## Materials and Methods

This descriptive cross-sectional study from Dec 2019 to Sep 2019 was conducted in the School of Paramedical Sciences, AJA University of Medical Sciences. The present study investigated by the ethics committee of the AJA University of Medical Sciences and approved with the code IR.AJAUMS.REC.1397.087. Using the formula for calculating the sample size and according to the results of similar studies (3, 10), 200 samples were calculated.

A total of 200 clinical samples from 63 patients admitted to different wards of AJA hospitals in Tehran were collected. Samples included blood (63 samples), urine (63), catheter (23 samples), discharge (17), ulcers (16 samples), sputum (12 samples), and nasal swabs (6 samples) which were referred to the paramedical faculty of the AJA University of Medical Sciences under sterile conditions. Inclusion criteria to study were included hospitalization in different wards of the hospital and long-term treatment with various antibiotics, and exclusion criteria were included outpatient treatment (no hospitalization) and no long-term use of antibiotics.

The samples were first cultured on blood Agar medium and incubated for 24h at 37°C. After observing the colonies, standard biochemical tests were performed to confirm the isolates including catalase test, Gram-staining, and then bacterial culture on mannitol salt agar media (mannitol fermentation test), Baird-Parker agar (formation of black colonies with clear and opaque halos), DNase and coagulase tests (14).

### Antimicrobial Susceptibility Test

This test performed by Müller–Hinton agar (MHA) using the standard antibiotic disk including penicillin (10 IU), ciprofloxacin (5 µg), chloramphenicol (30 µg), gentamicin (10 µg), doxycycline (30 µg), Tetracycline (30 µg), clindamycin (2 µg), cotrimoxazole (25 µg), ampicillin (15 µg), erythromycin (15 µg), cephalothin (30 µg) and ceftiofloxacin (30 µg), purchased from HiMedia company (Mumbai, India). (10, 14). The isolates were further screened for methicillin resistance by the ceftiofloxacin disk (15). In these tests, *S. aureus* ATCC 33591 was used as a positive control. The results exegesis conducted using Clinical and Laboratory Standards Institute guidelines (16).

### Phenotypic Evaluation of Biofilm Producing Strains

Congo red and a modified microtiter plate (MTP) assay were used to identify biofilm-producing strains. Confirmed isolates were cultured on brain heart infusion (BHI) agar medium containing 0.8 g/L Congo red and 36 g/L sucrose. After 24h of incubation at 37°C, black colonies as strong biofilms, dark red colonies as weak biofilms and light red colonies as negative biofilm strains were considered (17).

To quantitatively evaluate the production of biofilm by MTP assay, from the samples enriched on trypticase soy broth (TSB) medium, turbidity equivalent to 0.5 McFarland was prepared and then 200 µL of each suspension was transferred to wells of 96-well polyester microplate and incubated for 20h at 37°C. Then, the wells washed (4 times) using phosphate buffered saline (PBS) and dried completely. Next, the wells were stained with crystal violet dye (1%) for 15 minutes and to remove the dye from the bacterial wall, 100 µL of a mixture of isopropyl alcohol 10% and ethanol 70% was added to each well. Finally, the light absorption of each well at 570 nm was investigated using an ELISA reader. Finally, the optical density (OD) of the wells were measured using an ELISA reader at a wavelength of 570 nm. The test was conducted in triplicate. Exegesis of results were performed as per the criteria explained (18) and the bacteria were divided into weak (non-producer), moderate and strong biofilm producers. *S. aureus* ATCC 25923 was used as positive control, for the biofilm assay.

### DNA Extraction

DNA extraction was performed by the boiling technique using lysis buffer (1% Triton x100, 0.5% Tween 20, Tris 10 mmol with pH: 8 and EDTA 1 mmol) (19).

### Molecular Confirmation of *S. aureus* Isolates

Amplifying the thermonuclease gene by polymerase chain reaction (PCR) was used for molecular confirmation of isolates (Table 1). For this test, distilled water and *S. aureus* ATCC 33591 were utilized as negative and positive controls, respectively. The final volume of each reaction was considered to be 20 µL and the PCR reaction temperature program is shown in table 2. The products of PCR were evaluated using 1% agarose gel and UV transilluminator. Samples with 279 bp band were considered as *S. aureus* (20).

### Molecular Identification of Biofilm-Producing Strains

Amplification of *icaABCD* operon genes (with *icaA*, *icaD*, *icaC* and *icaB* genes) was used to identify biofilm-producing strains by PCR (Table 1). Distilled water and *S. aureus* ATCC 25923 were used as negative and positive controls, respectively, for this test. The final volume of each reaction was considered to be 20 µL and the PCR reaction temperature program of this operon is shown in Table 2. The products of PCR were evaluated using 1% agarose gel and UV transilluminator. The size of products of the genes are shown in Table 1 (21).

### Statistical Analysis

Data are analyzed by SPSS 20 (SPSS Inc., Chicago, IL., USA).  $\chi^2$  (Chi-square) test was utilized for data analysis. P-value<0.05 was considered statistically significant.

Table 1. Primers used in the study

Gene	Product size (bp)	Primer sequence	Reference
<i>nuc</i>	279	F: GCGATTGATGGTGATACGGTT R: AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC	20
<i>icaA</i>	188	F: ACACTTGCTGGCGCAGTCAA R: TCTGGAACCAACATCCAACA	21
<i>icaB</i>	880	F: AGAATCGTGAAGTATAGAAAATT R: TCTAATCTTTTTCATGGAATCCGT	21
<i>icaC</i>	1066	F: ATGGGACGGATTCCATGAAAAAGA R: TAATAAGCATTAATGTTC AATT	21
<i>icaD</i>	198	F: ATGGTCAAGCCCAGACAGAG R: AGTATTTTCAATGTTTAAAGCAA	21

Table 2. PCR reaction program (30 cycles)

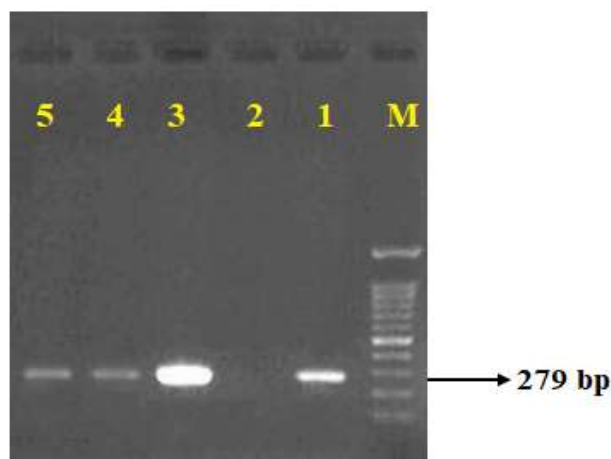
Gene	Steps, temperature and time of PCR reaction				
	Primary denaturation	Denaturation	Annealing	Extension	Final extension
<i>nuc</i>	94°C, 5 min	94°C, 30 sec	55°C, 55 sec	72°C, 60 sec	72°C, 10 min
<i>icaA</i>	94°C, 5 min	94°C, 60 sec	55°C, 60 sec	72°C, 60 sec	72°C, 10 min
<i>icaB</i>	94°C, 5 min	94°C, 60 sec	52°C, 30 sec	72°C, 90 sec	72°C, 10 min
<i>icaC</i>	94°C, 5 min	94°C, 60 sec	55°C, 30 sec	72°C, 30 sec	72°C, 10 min
<i>icaD</i>	94°C, 5 min	94°C, 0 sec	55°C, 30 sec	72°C, 60 sec	72°C, 10 min

## Results

Out of 200 cultured clinical specimens, 83 (41.5%) cases were phenotypically identified as *S. aureus*; 23 isolates (27.71%) from urine, 17 isolates (20.48%) from catheter, 15 isolates (18.07%) from blood, 12 isolates (14.45%) from wound, 9 isolates (10.84%) from secretions, 5 isolates (6.02%) from nasal swabs and 2 isolates (2.40%) from sputum were isolated, that all phenotypically confirmed isolates had *nuc* gene by molecular tests (Figure 1).

### Antimicrobial Resistance Patterns

The results of the antimicrobial resistance test are shown in Table 3.



**Figure 1.** Electrophoresis of *nuc* gene PCR product lane M -marker 100 bp, lane 1- Positive control (*S. aureus* ATCC33591), lane 2- Negative control (distilled water), lanes 3 to 5- Study samples

**Table 3.** Antibiogram test results of *Staphylococcus aureus* isolates

Antibiotic	Resistant/ n (%)	Intermediate/ n (%)	Sensitive/ n (%)
Penicillin (10 IU)	78 (94*)	-	5 (6)
Ciprofloxacin (5 µg)	35 (43)	2 (2)	46 (55)
Tetracycline (30 µg)	60 (72)	10 (12)	13 (16)
Chloramphenicol (30 µg)	36 (43)	24 (29)	23 (28)
Cefoxitin (30 µg)	42 (51)	-	41 (49)
Gentamicin (10 µg)	37 (45)	1 (1)	45 (54)
Erythromycin (15 µg)	36 (43)	3 (4)	44 (53)
Cephalothin (30 µg)	27 (33)	12 (14)	44 (53)
Ampicillin (15 µg)	45 (54)	9 (11)	29 (35)
Clindamycin (2 µg)	23 (28)	-	60 (72)
Cotrimoxazole (25 µg)	32 (39)	4 (5)	47 (56)
Doxycycline (30 µg)	3 (4)	5 (6)	75 (90)

\* Percentages are rounded

The highest resistance of isolates was to penicillin (94%), tetracycline (72%), ampicillin (54%) and cefoxitin (51%), respectively, and the highest susceptibility of isolates was reported to doxycycline (90%), clindamycin (72%), cotrimoxazole (56%) and ciprofloxacin (55%), respectively. Based on the results, 51% (42 cases) of isolates were considered as Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) strains.

### Biofilm Formation

According to the results of the Congo red test, out of 83 isolates, 23 (27.70%) isolates had a black colony (strong biofilm), 31 (37.30%) isolates had a dark red colony (weak biofilm) and 29 (35%) isolates with bright red colonies (lacking the ability to produce biofilm). The results of quantitative biofilm formation test

(MTP) showed that 29 (35%) isolates had strong biofilm, 25 (30%) isolates had weak biofilm and 29 (35%) isolates lacked the ability to produce biofilm. Overall, 54 (65%) isolates were considered as positive biofilm strains.

Based on the results of table 4, a statistically significant difference was observed between qualitative results (Congo red) and quantitative results (MTP) of biofilm production by chi-square test ( $P < 0.05$ , 0.001,  $X^2 = 54.9$ ,  $df = 4$ ).

As shown in Table 5, there is a statistically significant difference between the microbial resistance of positive and negative biofilm of *S. aureus* strains to the antibiotics of ciprofloxacin, cefoxitin, gentamicin, erythromycin, cephalothin and cotrimoxazole ( $P < 0.05$ ).

**Table 4.** Comparison of quantitative (Congo red) and qualitative (MTP) test results of biofilm production

Congo red test	MTP test			Total
	Strong adherence	weak adherence	No adhesion	
Black colony	17	6	0	23
Dark red colony	12	19	0	31
Bright red colonies	0	0	29	29
Total	29	25	29	83

**Table 5.** Comparison of antimicrobial resistance pattern in biofilm-negative and biofilm- positive isolates

Antibiotic	BP <sup>1</sup> (n= 54) / n (%)	BN <sup>2</sup> (n= 29) / n (%)	P-value
Penicillin	54 (100*)	24 (83)	0.465
Ciprofloxacin	33 (61)	2 (7)	0.026
Tetracycline	42 (78)	18 (62)	0.185
Chloramphenicol	25 (46)	11 (38)	0.505
Cefoxitin	40 (74)	2 (7)	0.007
Gentamicin	37 (100)	-	0.002
Erythromycin	36 (100)	-	0.002
Cephalothin	27 (100)	-	0.002
Ampicillin	31 (57)	14 (48)	0.427
Clindamycin	17 (31)	6 (21)	0.315
Cotrimoxazole	32 (100)	-	0.002
Doxycycline	2 (3)	1 (3)	-

- Biofilm producer
  - Biofilm non-producer
- Percentages are rounded

Of the total isolates, 47 (57%) were multidrug-resistant that included all biofilm-positive isolates, 47 (57%), while 7 (13%) were non-MDR. All the biofilm negative isolates were non-MDR isolates ( $P < 0.05$ ; Table 6). Also, 24 (29%) of the isolates were MRSA. It is worth noting, 44% of biofilm positive

isolates were MRSA, while all biofilm negative isolates were methicillin-sensitive *S. aureus* (MSSA) ( $P < 0.05$ ; Table 6). There was a statistically significant difference between the type of strain and biofilm production by  $\chi^2$  test ( $P < 0.05$ ,  $0.001$ ,  $\chi^2 = 108.1$ ,  $df = 3$ ).

**Table 6.** Comparison of MDR and resistance to methicillin in biofilm-negative and biofilm- positive isolates

Isolate type	MDR <sup>1</sup> , n (%)	Non-MDR, n (%)	MRSA, n (%)	MSSA <sup>2</sup> , n (%)
Biofilm producer (n= 54)	47 (87*)	7 (13)	24 (44)	30 (56)
Biofilm non-producer (n= 29)	0 (-)	29 (100)	0 (-)	29 (100)
Total (n= 83)	47 (57)	36 (43)	24 (29)	59 (71)

- Multidrug-resistant
  - Methicillin-sensitive *S. aureus*
- \* Percentages are rounded

### Molecular Evaluation of *icaABCD* Operon

In the Molecular evaluation of *icaABCD* operon, the frequency of *icaA*, *icaB*, *icaC* and *icaD* genes were 67.4% (56 isolates), 60.2% (50 isolates), 61.4% (51 isolates) and 62.6% (52 isolates), respectively. Accordingly, the most common gene encoding biofilm

production in the studied isolates are *icaA* and *icaD* genes. Out of 83 isolates, 50 isolates (60%) had both *icaA* and *icaD* genes and 34 isolates (41%) had all *ica* operon genes. There was not statistically significant difference between the presence of *ica* operon genes in *S. aureus* isolates.



**Figure 2.** Electrophoresis of *ica* operon genes PCR products lane M -marker 100 bp, lanes 1 and 2- positive samples for *icaA* gene (188 bp), lanes 3 to 5- positive samples with *icaD* gene (198 bp), lanes 6 and 7- positive samples for *icaC* gene (1066 bp), lanes 8 and 9- positive samples for *icaB* gene (880 bp), lane 10- Negative control (distilled water)

## Discussion

According to the results of this study, the prevalence of *S. aureus* in clinical specimens was 41.5%. The results of various studies have shown similarities and differences in this field, including: Neopane *et al.* (2018) in Nepal reported that the prevalence of *S. aureus* in clinical specimens is 28.66% (11). In another study in India (2018), Manandhar *et al.* reported a prevalence 43% of this bacterium in clinical specimens (23). In a similar study in Tehran that it conducted by Mashaieghi and Amini (2018), the prevalence of *S. aureus* was calculated to be 17.09% (24). The difference in the prevalence of *S. aureus* in clinical specimens may be related to differences in specimen type, geographical location, sampling time, sampling location, etc.

Based on the results of antibiogram test in the present study, the highest resistance of isolates was to penicillin (94%), tetracycline (72%), ampicillin (54%), cefoxitin (51%) and gentamicin (37%), respectively. The results of Nourbakhsh and Momtaz's study (2016) showed that the highest resistance of *S. aureus* isolates in clinical samples was related to penicillin (100%) and tetracycline (76%), which is consistent with the results of the present study (25). In the study of Sadri *et al.*, resistance to tetracycline was reported to be 42% (26). In the study of Ahmadi *et al.*, 20% resistance to gentamicin was reported in Kermanshah, also, the resistance to ampicillin was reported to be 55% (27). 23% resistance of *S. aureus* strains to gentamicin was also observed in the study of Hauschild *et al.* (28). A study by Mirzaee *et al.* in Tehran showed that more than 80% of *S. aureus* isolates are ampicillin-resistant (29). The present study shows the high prevalence of MRSA strains (51%) in different wards of AJA hospitals that comparing these results with the results of other studies in this field, showed many differences and similarities. Abdollahi *et al.* (2011) in Fars reported that the rate of methicillin-resistance in *S.*

*aureus* isolates was 47.56% (30). Also, several studies were conducted on the prevalence of MRSA isolates, which 43.5%, 50%, 12.6% and 30% of isolates in the study of Abu-Shady *et al.* (31), Hassanzadeh *et al.* (34), Tabaei *et al.* (32) and Rahimi *et al.* (33), were resistant to methicillin, respectively. The resistance of *S. aureus* isolates to methicillin can be due to overuse of antimicrobial compounds for disinfecting hospital environments, treatment of infections, transfer of patients colonized with these strains from one hospital to another, etc (22). As a result, it is necessary to monitor the use of drugs and disinfectant compounds, teach the correct methods of using antibiotics and infection control proceedings in all wards of hospitals.

Numerous studies on the pattern of antibiotic resistance of *S. aureus* isolates have been published from different wards of hospitals in different regions that are consistent or inconsistent with the results of our study. In the study of Ahmadi *et al.* (2014), the highest antibiotic resistance was reported to penicillin, tetracycline, methicillin and ampicillin (27). Also, in the study of Hatefizade *et al.* in Tehran (2016), the highest resistance to penicillin and ampicillin was observed (35), which these results were consistent with the results of the present study. In 2017, a study was conducted by Motamedi *et al.* in Hamedan. The results of this study showed that the highest antibiotic resistance is to erythromycin (36), which is in contrary to the results of the present study. These differences in the results can be due differences in a geographical area, the hygienic status of hospital wards (34) as well as creating chromosomal resistance during generation or transmission of resistance factors between bacterial species (36).

In the present study, in addition to emphasizing the spread of multiple drug resistance in clinical specimens, the ability to produce biofilm as a

phenotype was reported to be 65%; This was consistent with the results of studies by Namvar *et al.* (2013) (13) and Croes *et al.* (2009) (37). In a similar study by Gad *et al.* (2009), the ability to produce biofilm was reported in 83% of isolates (38). In another study in Nepal conducted by Neopane *et al.* (2018), biofilm-producing strains were reported about 70% (10). Various factors can contribute to biofilm formation, including environmental factors (such as sugars, or proteases in the growth medium), nutrient availability, geographical origin, sample type, area surface (rough or smooth), porosity, Environmental stresses (such as antibiotic exposure), surface adhesion characteristics, and bacterial genetic arrangement. Furthermore, mutations in the *ica* operon genes and the regulatory genes of this operon are associated with a reduction in the ability of *S. aureus* to produce biofilms (10).

In the present study, the frequency of *icaA*, *icaB*, *icaC* and *icaD* genes were 67.4% (56 isolates), 60.2% (50 isolates), 61.4% (51 isolates) and 62.6% (52 isolates), respectively, which is consistent with the results of Nourbakhsh and Momtaz's study in 2016 (25). In a study by Eftekhari *et al.* (2011), 73% of the isolates contained the *icaA* and *icaB* genes (22). Also, in the study of Namvar *et al.*, all isolates have had *icaC* gene (13). In the present study, 60% of the isolates had both *icaA* and *icaD* genes and 41% of the isolates had all the *ica* operon genes, while strong biofilm was observed in only 35% of the isolates. In the study of Mirzaee *et al.* (2014) in Tehran, it was found that about 28% of the isolates had all the *ica* operon genes, while only half of these isolates were able to form a strong biofilm (29). In the Mashaieki and Amini's study (2016), 75% of *S. aureus* isolates have had both *icaA* and *icaD* genes (24). In the study of the presence of genes and phenotypic biofilm formation, differences were observed that depending on the factors mentioned earlier. Therefore, the presence or absence of a gene alone can't play a major role in

biofilm formation. In the present study, there were two genes (*icaA* and *icaD*) in 60% of isolates and there were in 41% of isolates all of *ica* operon genes. The isolates were placed between strong and weak spectra in biofilm formation, but none of these isolates were seen with the inability to form biofilms.

## Conclusion

Pursuant to the results of this study, *S. aureus* isolates have had high resistance to most of the studied antibiotics (especially methicillin). Also, the significant abundance of biofilm-producing genes in these isolates can be effective in increasing the multiple drug resistance, persistence of bacteria in the environment (especially in hospital environments). In the present study, there was a statistically significant relationship between biofilm formation and antibiotic resistance ( $P < 0.05$ ). The presence of biofilm-producing genes and their role in antibiotic resistance can have consequences such as prolonged hospitalization, increased costs, and increased mortality (especially those admitted to the burn ward, immunosuppressed patients, and those undergoing aggressive treatments such as the use of artificial implants).

## Acknowledgment

The authors thank the Research Assistance of AJA University of Medical Sciences and the staff of AJA hospitals in Tehran for their assistance in conducting this study.

## Conflict of Interest

Authors declared no conflict of interests.



## بررسی فنوتیپی و ژنوتیپی تشکیل بیوفیلم توسط *استافیلوکوکوس اورئوس* های جدا شده از نمونه‌های بالینی و ارتباط آن با مقاومت میکروبی

حسین قادری<sup>۱</sup>، عبادالله شیری ملک آباد<sup>۲</sup>، محمود وحیدی<sup>۳</sup>، علیرضا داداشی<sup>۴\*</sup>

۱. گروه باکتری‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران
۲. گروه آمار زیستی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی آجا، تهران، ایران
۳. گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی آجا، تهران، ایران
۴. گروه بیماری‌های عفونی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی آجا، تهران، ایران

### چکیده

### اطلاعات مقاله

**زمینه و اهداف:** *استافیلوکوکوس اورئوس* از مهمترین عوامل عفونت‌های بیمارستانی، با تشکیل بیوفیلم در ایجاد بیماری‌های مزمن و تقویت مقاومت دارویی موثر است. مطالعه حاضر با هدف بررسی فنوتیپی و ژنوتیپی تشکیل بیوفیلم توسط جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* از نمونه‌های بالینی و ارتباط آن با مقاومت میکروبی انجام گردید.

**مواد و روش کار:** در این مطالعه مقطعی-توصیفی از دی ماه ۱۳۹۷ تا شهریور ماه ۱۳۹۸، ۲۰۰ نمونه بالینی از بیمارستان‌های آجا در تهران اخذ گردید. کلیه نمونه‌ها با استفاده از محیط‌های کشت بلاد آگار، مانیتول سالت آگار، بردپارکر و تست‌های کاتالاز، OF و کوآگولاز مورد بررسی قرار گرفت. تعیین مقاومت جدایه‌ها با تست آنتی‌بیوگرام انجام شد. به منظور شناسایی حضور ژن‌های کدکننده بیوفیلم شامل *icaA*، *icaB*، *icaC* و *icaD* از روش Multiplex PCR استفاده گردید. داده‌ها با نرم افزار SPSS و آزمون کای ۲ بررسی گردید.

**یافته‌ها:** از ۲۰۰ نمونه کشت شده، ۸۳ (۴۱/۵٪) جدایه به عنوان *استافیلوکوکوس اورئوس* تأیید گردید. بیشترین مقاومت در پنی‌سیلین (۹۴٪)، تتراسایکلین (۷۲٪)، آمپی‌سیلین (۵۴٪) و سفکسیتین (۵۱٪) مشاهده شد. تولید بیوفیلم به صورت فنوتیپی در ۶۵٪ جدایه‌ها گزارش شد. فراوانی حضور ژن‌های *icaA*، *icaB*، *icaC* و *icaD* به ترتیب ۶۷/۴٪، ۶۰/۲٪، ۶۱/۴٪ و ۶۲/۶٪، برآورد گردید. ۸۷٪ از سویه‌های مولد بیوفیلم توانایی مقاومت چندگانه داشتند، در مقابل سویه‌های بیوفیلم منفی فاقد این توانایی بودند ( $P < 0.05$ ).

**نتیجه‌گیری:** با توجه به نتایج حاصله، سویه‌های مولد بیوفیلم تمایل بیشتری برای ایجاد مقاومت میکروبی، مقاومت چند دارویی و مقاومت به متی‌سیلین نشان می‌دهند.

**کلید واژه‌ها:** *استافیلوکوکوس اورئوس*، بیوفیلم، مقاومت ضد میکروبی، MRSA

کپی‌رایت © مجله میکروبیولوژی پزشکی ایران: دسترسی آزاد؛ کپی برداری، توزیع و نشر برای استفاده غیرتجاری با ذکر منبع آزاد است.

### تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۳۹۹/۰۲/۲۵

پذیرش: ۱۳۹۹/۰۶/۱۰

انتشار آنلاین: ۱۳۹۹/۰۷/۰۵

موضوع: باکتری‌شناسی پزشکی

### نویسنده مسئول:

علیرضا داداشی، گروه بیماری‌های عفونی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی آجا، تهران، ایران  
ایمیل: [drdadashialireza@gmail.com](mailto:drdadashialireza@gmail.com)

### مقدمه

نفوذناپذیری آنتی‌بیوتیک در ماتریکس پلیمری، تسهیل در انتقال ژن از طریق کانزوگاسیون و افزایش جهش‌های ژنتیکی به واسطه این اتصالات باکتریایی، به وجود آمدن سویه‌های ژنوتیپی جدید در اثر موتاسیون یا جهش در داخل بیوفیلم و فعال شدن ژن‌های مسئول ویروالانس باکتری در شکل بیوفیلم، اشاره کرد (۲ و ۳).

*استافیلوکوکوس اورئوس* یکی از مهمترین باکتری‌های بیماری‌زا است که می‌تواند در انسان و حیوانات ایجاد بیماری کند

بیوفیلم شامل مجموعه‌ای از میکروارگانیسم‌ها است که در سطح و ماتریکس یک جسم غیر زنده و یا یک موجود زنده به هم متصل شده و سبب ایجاد یک سطح ژله‌ای می‌شوند (۱). این لایه علاوه بر اینکه محیطی مناسب برای باکتری فراهم می‌کند، شرایط ایدئالی را برای رشد و تکثیر آن در محیط‌های ناپایدار به وجود می‌آورد. از مهمترین ویژگی‌های بیوفیلم می‌توان به کمک به بقاء باکتری در شرایط سخت محیطی، نقش در بیماری‌زایی و ایجاد بیماری‌های مزمن، اثرگذاری آن در ایجاد و تقویت مقاومت دارویی از طریق



کندگان این وسایل پزشکی را فراهم کند (۱۳). به منظور جلوگیری از تشکیل بیوفیلم و متعاقب آن ایجاد مقاومت‌های میکروبی، افزایش طول بستری بیماران، تحمیل هزینه‌های بیشتر و افزایش مرگ و میر (به خصوص در استافیلوکوکوس اورئوس‌های مقاوم شده به انواع آنتی‌بیوتیک‌ها)، استفاده صحیح از آنتی‌بیوتیک‌ها (تحت نظر پزشک) و همچنین عدم مصرف خودسرانه داروها و ترکیبات ضد میکروبی، ارزیابی منظم مقاومت و بیان ژن‌های مربوط به آن در سطوح بیمارستانی می‌تواند از بروز مشکلات اشاره شده تا حد زیادی بکاهد.

با توجه به شیوع بالای عفونت‌های بیمارستانی ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس و همچنین گسترش عوامل افزایش‌دهنده مقاومت آنتی‌بیوتیکی، مطالعه حاضر با هدف ارزیابی فنوتیپی و ژنوتیپی تشکیل بیوفیلم توسط استافیلوکوکوس اورئوس‌های جدا شده از نمونه‌های بالینی اخذ شده از بیمارستان‌های آجا در تهران و ارتباط آن با مقاومت ضد میکروبی انجام گردید.

### روش پژوهش

این مطالعه مقطعی - توصیفی، از دی ماه ۱۳۹۷ تا شهریور ماه ۱۳۹۸ به مدت ۸ ماه، در دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی آجا اجرا گردید. مطالعه حاضر در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی آجا بررسی و با کد IR.AJAUMS.REC.1397.087 تایید گردیده است.

با استفاده از فرمول محاسبه حجم نمونه و با توجه به نتایج مطالعات مشابه (۳ و ۱۰)، تعداد ۲۰۰ نمونه جهت بررسی محاسبه گردید.

تعداد ۲۰۰ نمونه بالینی از ۶۳ بیماری بستری در بخش‌های مختلف بیمارستان‌های سطح آجا در تهران جمع‌آوری گردید. نمونه‌ها شامل خلط (۱۲ نمونه)، خون (۶۳ نمونه)، سوپ بینی (۶ نمونه)، ترشحات (۱۷)، زخم (۱۶ نمونه)، کاتتر (۲۳ نمونه) و ادرار (۶۳) بودند که در شرایط استریل و با رعایت زنجیره سرد به دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی آجا ارجاع شدند. معیارهای ورود به مطالعه شامل بستری شدن در بخش‌های مختلف بیمارستان و درمان طولانی مدت با انواع آنتی‌بیوتیک‌ها، و معیارهای خروج از مطالعه شامل درمان سرپایی (عدم بستری) و عدم استفاده طولانی مدت از آنتی‌بیوتیک در نظر گرفته شد. متغیرهای مورد مطالعه در تحقیق حاضر شامل: حضور استافیلوکوکوس اورئوس در نمونه‌های بالینی، مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها و توانایی ژنوتیپی و فنوتیپی جدایه‌ها در تشکیل بیوفیلم است.

(۴). این باکتری عامل ایجادکننده بسیاری از بیماری‌ها در انسان، از عفونت‌های پوستی تا عفونت‌های حاد و تهاجمی مانند پنومونی، عفونت بافت‌های نرم، استخوان، دریچه‌های قلب و سپتیسمی‌های کشنده است. استافیلوکوکوس اورئوس یکی از مهمترین عوامل باکتریایی بوده و مسئول ۴۰-۲۰٪ موارد مرگ و میر علاوه است (۵ و ۶). در کنار بروز مقاومت، این باکتری توانایی تولید عوامل بیماری‌زای مختلفی از قبیل توکسین، آنتی‌ژن‌های سطحی، آنزیم‌های خارج سلولی و برخی عوامل وابسته و متصل به کپسول پلی ساکاریدی بنام بیوفیلم را دارا است (۶ و ۷).

در باکتری استافیلوکوکوس اورئوس نقش بیماری‌زا بودن بیوفیلم بسیار مهم است. حضور این لایه توسط گروه خاصی از اپرون‌های ساختاری به نام اپرون‌های داخل سلولی یا Intra Cellular Adhesin (ica) کد می‌شود که دارای لوکوس‌های ژنی مختلف شامل *icaA* *icaD* *icaB* و *icaC* است (۸، ۹ و ۱۰). یک القاگر اولیه برای شروع ساخت بیوفیلم در استافیلوکوکوس اورئوس است. این ژن با حضور UDP-Nacetylglucosamine فعالیت خود را آغاز می‌کند و تنها ژن *ica* است که خاصیت ترانسفرازی دارد. *icaD* یک انتقال‌دهنده پیام (چاپرون) به سایر ژن‌های این لوکوس است که با کمک *icaA* سبب فعال شدن آنزیم‌های خاصی برای ایجاد ارتباط و بیان ژن‌های *icaC* و *icaD* می‌شود، به طوری که وقتی همکاری *icaA* و *icaD* شروع می‌شود، میزان تولید بیوفیلم ۲۰ برابر افزایش می‌یابد (۹ و ۱۰). *icaC* ارتباط بین فضای داخلی و خارجی غشای سیتوپلاسمی باکتری را بر عهده دارد. این بخش سبب ارتباط *icaD* با قسمت خارجی غشاء سیتوپلاسمی با *icaB* می‌شود. *icaB* تنها لوکوسی است که به صورت خارج سیتوپلاسمی قرار گرفته است و ارتباط سطحی باکتری با پلی ساکاریدهای چسبنده داخل سلولی (polysaccharide intercellular adhesion) را حفظ می‌کند. یکی از عواملی که سبب افزایش میزان بیان این اپرون‌ها در استافیلوکوکوس اورئوس می‌شود، میزان ارتباط *icaB* و این پلی ساکاریدها است که هر چه این ارتباط بیشتر باشد، تولید بیوفیلم نیز به مراتب افزایش می‌یابد (۱۱).

در محیط‌های بیمارستانی بیوفیلم میکروبی روی سطوح مختلف به عنوان یک مخزن انتقال عفونت، مسئول ایجاد ۶۵٪ از عفونت‌های بیمارستانی مطرح می‌شوند (۱۲). حضور بیوفیلم سبب اتصال استافیلوکوکوس اورئوس به کاتترها، سوندهای ادراری و سایر ابزارآلات بیمارستانی می‌شود که می‌توانند با آلوده کردن این سطوح زمینه ایجاد عفونت در افراد بستری در بیمارستان و استفاده

برای بررسی کمی تولید بیوفیلیم با روش میکروپلیت تیتراسیون (MTP assay)، از نمونه‌های غنی شده بر روی محیط تریپتیکاز سوی برات (TSB) کدورتی معادل نیم مک فارلند تهیه و سپس  $200 \mu\text{L}$  از هر سوسپانسیون به چاهک‌های میکروپلیت ۹۶ خانه ای پلی استرین منتقل شد و به مدت ۲۰ ساعت در دمای  $37^\circ\text{C}$  درجه سلسیوس انکوبه شد. چاهک‌ها چهار بار با استفاده از فسفات بافر سالین (PBS) شست و شو داده و سپس به طور کامل خشک گردیدند. در مرحله بعد، برای رنگ‌آمیزی چاهک‌ها از رنگ کریستال ویوله ۱٪، به مدت ۱۵ دقیقه در هر چاهک استفاده شد. سپس رنگ موجود در هر چاهک با استفاده از آب مقطر شست و شو داده شده (۳بار) و برای آزادسازی رنگ موجود در دیواره باکتری‌هایی که مولد بیوفیلیم هستند،  $100 \mu\text{L}$  ایزوپروپیل الکل ۱۰ درصد به اضافه اتانول ۷۰ درصد به هر چاهک اضافه شد. در نهایت رنگ آزاد شده در هر چاهک در طول موج نوری  $570 \text{ nm}$  با استفاده از دستگاه الیزا ریدر بررسی گردید. برای اطمینان از صحت کار از هر نمونه در ۳ چاهک ریخته شده (به صورت تریپلیکس) و سپس میانگین OD آنها مورد بررسی قرار گرفت. بر این اساس نمونه‌هایی که OD آنها زیر  $0.35$  باشد منفی، نمونه‌هایی که OD آنها بین  $0.35-0.49$  باشد چسبندۀ ضعیف و نمونه‌هایی با OD بالاتر از  $0.5$  چسبندۀ قوی در نظر گرفته شدند (۱۸). در این تست از سویه استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 25923 به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

### استخراج DNA

استخراج DNA جدایه‌های مورد مطالعه با استفاده از روش جوشاندن با بافر لیز کننده (۱٪ تریتون  $10 \times$ ،  $0.5$ ٪ توین ۲۰، تریس  $10 \text{ mmol}$  با  $\text{pH}: 8$  و  $1 \text{ mmol EDTA}$ ) انجام گردید (۱۹).

### تایید مولکولی جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*

برای تأیید مولکولی جدایه‌ها از تکثیر ژن اختصاصی ترمونوکلاز (*nuc*) با روش PCR استفاده شد (جدول ۱). در این تست از سویه استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 33591 به عنوان کنترل مثبت و از آب مقطر به عنوان کنترل منفی استفاده گردید. حجم نهایی هر واکنش  $20 \mu\text{L}$  در نظر گرفته شد. برنامه دمایی واکنش PCR در جدول ۲ آمده است. در ادامه محصولات حاصل از PCR با استفاده از ژل آگارز ۱٪ و دستگاه ترانس لومیناتور مورد ارزیابی قرار گرفت. نمونه‌های دارای باند  $279 \text{ bp}$  به عنوان *استافیلوکوکوس اورئوس* در نظر گرفته شد (۲۰).

نمونه‌های اخذ شده ابتدا بر روی محیط Blood Agar کشت داده شد و بمدت ۲۴ ساعت در دمای  $37^\circ\text{C}$  درجه سلسیوس انکوبه شدند. پس از مشاهده کلنی‌ها، تست‌های استاندارد بیوشیمیایی شامل رنگ‌آمیزی گرم، تست کاتالاز، و سپس کشت باکتری بر روی محیط‌های کشت مانیتول سالت آگار (تست تخمیر مانیتول)، بردپارکر آگار (تشکیل کلنی‌های سیاه رنگ با هاله‌های شفاف و کدر اطراف آن) و تست‌های DNase و کوآگولاز، جهت تأیید جدایه‌ها انجام گرفت (۱۴).

### ارزیابی حساسیت ضد میکروبی (تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی)

برای انجام این تست از محیط کشت مولر هینتون آگار و ۱۲ دیسک آنتی‌بیوتیکی مختلف شامل پنی‌سیلین (۱۰ IU)، سیپروفلوکساسین ( $5 \mu\text{g}$ )، کلرامفنیکل ( $30 \mu\text{g}$ )، جنتامایسین ( $10 \mu\text{g}$ )، داکسی‌سیلین ( $30 \mu\text{g}$ )، تتراسایکلین ( $30 \mu\text{g}$ )، کلیندامایسین ( $2 \mu\text{g}$ )، کوتریموکسازول ( $25 \mu\text{g}$ )، آمپی‌سیلین ( $15 \mu\text{g}$ )، اریترومایسین ( $15 \mu\text{g}$ )، سفالوتین ( $30 \mu\text{g}$ ) و سفوکسیتین ( $30 \mu\text{g}$ ) (های مدبا، هند) استفاده شد (۱۰ و ۱۴). در این تست از استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 33591 به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید. پس از ۲۴ ساعت با اندازه‌گیری هاله عدم رشد در اطراف دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی و مقایسه آنها با جدول استاندارد CLSI نتایج به صورت مقاوم، حد واسط و حساس گزارش شدند (۱۵). کلیه جدایه‌های تأیید شده به عنوان *استافیلوکوکوس اورئوس* با استفاده از دیسک آنتی‌بیوتیکی سفوکسیتین ( $30 \mu\text{g}$ ) و با استفاده از روش فوق برای مقاومت به متی‌سیلین (MRSA) مورد بررسی قرار گرفتند؛ با توجه به جدول استاندارد CLSI، هاله عدم رشد اطراف دیسک به اندازه  $\geq 21$  به عنوان جدایه‌های MRSA در نظر گرفته شدند (۱۶). در این تست از استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 33591 به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید.

### تعیین فنوتیپی سویه‌های تولیدکننده بیوفیلیم

برای شناسایی سویه‌های مولد بیوفیلیم از روش تست کنگو رد آگار پلیت و روش اصلاح شده میکروپلیت استفاده شد. جدایه‌های تأیید شده بر روی محیط BHI agar حاوی  $0.8$  گرم در لیتر کنگورد و  $36$  گرم در لیتر سوکرز کشت داده شدند. پس از  $24$  انکوباسیون در  $37^\circ\text{C}$  درجه سلسیوس، کلنی‌های سیاه رنگ به عنوان بیوفیلیم قوی، کلنی‌های قرمز تیره بیوفیلیم ضعیف و کلنی‌های قرمز روشن به عنوان سویه‌های بیوفیلیم منفی در نظر گرفته شدند (۱۷).

شناسایی مولکولار سویه‌های تولید کننده بیوفیلم

برای شناسایی سویه‌های مولد بیوفیلم از تکثیر ژن‌های اپرون *icaABCD* (با ژن‌های *icaA icaB icaC icaD* و *icaB*) با روش PCR استفاده شد (جدول ۱). در این تست نیز از سویه استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس ATCC33591 به‌عنوان کنترل مثبت و از آب مقطر به‌عنوان کنترل منفی استفاده گردید. حجم نهایی

جدول ۱. پرایمرهای مورد استفاده در مطالعه (۲۰، ۲۱)

نام ژن	اندازه محصول (bp)	توالی پرایمر
<i>nuc</i>	۲۷۹	F: GCGATTGATGGTGATACGGTT R: AGCCAAGCCTTGACGAACCTAAAGC
<i>icaA</i>	۱۸۸	F: AACTTGCTGGCGCAGTCAA R: TCTGGAACCAACATCCAACA
<i>icaB</i>	۸۸۰	F: AGAATCGTGAAGTATAGAAAATT R: TCTAATCTTTTTCATGGAATCCGT
<i>icaC</i>	۱۰۶۶	F: ATGGGACGGATTCCATGAAAAAGA R: TAATAAGCATTAAATGTTCAATT
<i>icaD</i>	۱۹۸	F: ATGGTCAAGCCAGACAGAG R: AGTATTTTCAATGTTTAAAGCAA

جدول ۲. برنامه دمایی واکنش PCR برای ژن‌های مورد مطالعه (۳۰ سیکل)

نام مراحل، دما و زمان انجام واکنش PCR					
نام ژن	واسرشت اولیه	واسرشت	اتصال	گسترش	گسترش نهایی
<i>Nuc</i>	۹۴ د. س، * ۵ دقیقه	۹۴ د. س، ۳۰ ثانیه	۵۵ د. س، ۵۵ ثانیه	۷۲ د. س، ۶۰ ثانیه	۷۲ د. س، ۱۰ دقیقه
<i>icaA</i>	۹۴ د. س، ۵ دقیقه	۹۴ د. س، ۶۰ ثانیه	۵۵ د. س، ۶۰ ثانیه	۷۲ د. س، ۶۰ ثانیه	۷۲ د. س، ۱۰ دقیقه
<i>icaB</i>	۹۴ د. س، ۵ دقیقه	۹۴ د. س، ۶۰ ثانیه	۵۲ د. س، ۳۰ ثانیه	۷۲ د. س، ۹۰ ثانیه	۷۲ د. س، ۱۰ دقیقه
<i>icaC</i>	۹۴ د. س، ۵ دقیقه	۹۴ د. س، ۶۰ ثانیه	۵۵ د. س، ۳۰ ثانیه	۷۲ د. س، ۳۰ ثانیه	۷۲ د. س، ۱۰ دقیقه
<i>icaD</i>	۹۴ د. س، ۵ دقیقه	۹۴ د. س، ۳۰ ثانیه	۵۵ د. س، ۳۰ ثانیه	۷۲ د. س، ۶۰ ثانیه	۷۲ د. س، ۱۰ دقیقه

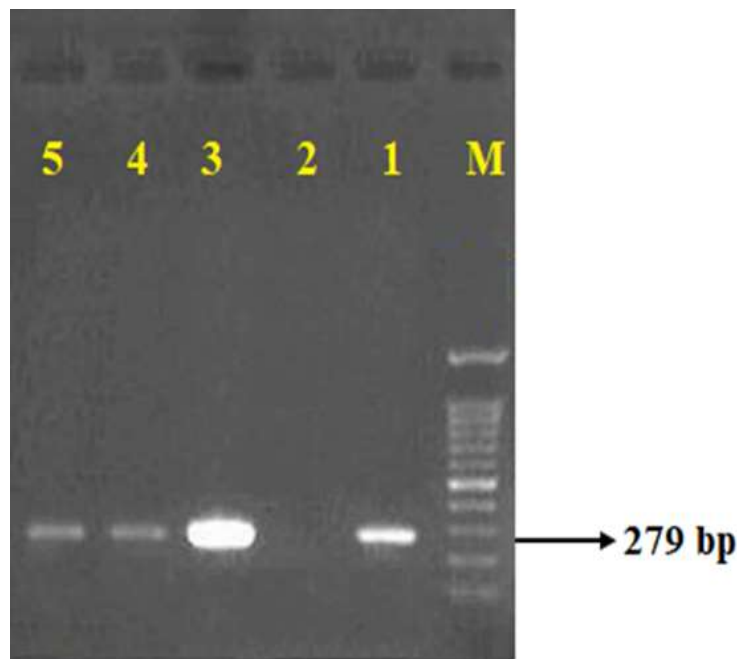
\* درجه سلسیوس

یافته‌ها

از مجموع ۲۰۰ نمونه بالینی کشت شده تعداد ۸۳ (۴۱/۵٪) مورد به صورت فنوتیپی به‌عنوان استافیلوکوکوس اورئوس مشخص گردید؛ در این میان تعداد ۲ جدایه (۲/۴۰٪) مربوط خلط، ۱۵ جدایه (۱۸/۰۷٪) از خون، ۵ جدایه (۶/۰۲٪) از سواپ بینی، ۹ جدایه (۱۰/۸۴٪) از ترشحات، ۱۲ جدایه (۱۴/۴۵٪) از زخم، ۱۷ جدایه (۲۰/۴۸٪) از کاتتر و ۲۳ جدایه (۲۷/۷۱٪) از ادرار جداسازی گردیدند، که در آزمون مولکولی کلیه جدایه‌های تأییدشده به‌صورت فنوتیپی، واجد ژن اختصاصی *nuc* بودند (شکل ۱).

تحلیل آماری

نتایج به‌دست‌آمده توسط نرم افزار آماری SPSS نسخه ۲۰ (SPSS Inc., Chicago, IL., USA)، با استفاده از آزمون  $\chi^2$  و سطح اطمینان ۰/۰۵ ( $P < 0/05$ ) آنالیز گردید. بین مقاومت آنتی‌بیوتیکی با تشکیل بیوفیلم ارتباط آماری معنی‌داری دیده شد. همچنین بین نتایج کمی (تست کنگو رد آگار) و کیفی (تست میکروپلت تیتراسیون) تشکیل بیوفیلم ارتباط آماری معنی‌داری دیده شد. ارتباط آماری بین مقاومت چند دارویی جدایه‌ها با تشکیل بیوفیلم مشاهده شد و همچنین ارتباط آماری بین وجود ژن‌های مثبت و منفی اپرون *icaABCD* تعیین شد. در این آزمون‌ها ۰/۰۵  $P$ -value به‌عنوان تفاوت معنی‌دار آماری در نظر گرفته شد.



شکل ۱. الکتروفورز محصول PCR ژن *nuc*

ستون M- مارکر 100 bp، ستون ۱- کنترل مثبت (سویه استاندارد/ستافیلوکوکوس اورئوس ATCC33591)، ستون ۲- کنترل منفی (آب مقطر)، ستون های ۳ تا ۵- نمونه های مورد مطالعه

### الگوی مقاومت ضد میکروبی

نتایج حاصل از تست آنتی بیوگرام در جدول ۳ آمده است.

براین اساس بیشترین مقاومت جدایه ها به ترتیب به آنتی بیوتیک های پنی سیلین (۹۴٪)، تتراسایکلین (۷۲٪)، آمپی سیلین

(۵۴٪) و سفوکسیتین (۵۱٪) بود. بیشترین حساسیت جدایه ها نیز به ترتیب به آنتی بیوتیک های داکسی سیلین (۹۰٪)، کلیندامایسین (۷۲٪)، کوتریموکسازول (۵۶٪) و سیپروفلوکساسین (۵۵٪) گزارش شد. بر اساس نتایج به دست آمده ۵۱٪ (۴۲ مورد) از جدایه ها به عنوان سویه های MRSA در نظر گرفته شدند.

جدول ۳. فراوانی و درصد مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس به آنتی بیوتیک های مختلف

نام آنتی بیوتیک	فراوانی و درصد نمونه های مقاوم	فراوانی و درصد نمونه های حد واسط	فراوانی و درصد نمونه های حساس
پنی سیلین	۷۸ (۹۴٪)*	-	۵ (۶٪)
سیپروفلوکساسین	۳۵ (۴۳٪)	۲ (۲٪)	۴۶ (۵۵٪)
تتراسایکلین	۶۰ (۷۲٪)	۱۰ (۱۲٪)	۱۳ (۱۶٪)
کلرامفنیکل	۳۶ (۴۳٪)	۲۴ (۲۹٪)	۲۳ (۲۸٪)
سفوکسیتین	۴۲ (۵۱٪)	-	۴۱ (۴۹٪)
جنتامایسین	۳۷ (۴۵٪)	۱ (۱٪)	۴۵ (۵۴٪)
اریترومایسین	۳۶ (۴۳٪)	۳ (۴٪)	۴۴ (۵۳٪)
سفالوتین	۲۷ (۳۳٪)	۱۲ (۱۴٪)	۴۴ (۵۳٪)
آمپی سیلین	۴۵ (۵۴٪)	۹ (۱۱٪)	۲۹ (۳۵٪)
کلیندامایسین	۲۳ (۲۸٪)	-	۶۰ (۷۲٪)
کوتریموکسازول	۳۲ (۳۹٪)	۴ (۵٪)	۴۷ (۵۶٪)
داکسی سیلین	۳ (۴٪)	۵ (۶٪)	۷۵ (۹۰٪)

\* درصدها گرد شده اند.

## تشکیل بیوفیلم

در تجزیه و تحلیل آماری نتایج با سطح اطمینان ۰/۰۵، اختلاف آماری معنی‌داری بین نتایج کیفی (تشکیل کلنی) و نتایج کمی (میکروپلیت تیتراسیون) تولید بیوفیلم با آزمون مربع کای مشاهده گردید ( $P < 0/001, X^2=54.9, df=4$ ).

همانطور که در جدول ۵ مشخص شده است، از نظر آماری اختلاف معنی‌داری بین مقاومت میکروبی سویه‌های بیوفیلم مثبت و منفی استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین، سفوکسیتین، جنتامایسین، اریترومایسین، سفالوتین و کوتریموکسازول وجود دارد ( $P < 0/05$ ، جدول ۵).

با توجه به نتایج مربوط به آزمون کیفی تشکیل بیوفیلم از مجموع ۸۳ جدایه، ۲۳ (۲۷/۷۰٪) جدایه دارای کلنی سیاه (بیوفیلم قوی)، ۳۱ (۳۷/۳۰٪) جدایه دارای کلنی قرمز تیره (بیوفیلم ضعیف) و ۲۹ (۳۵٪) جدایه دارای کلنی‌های قرمز روشن (فاقد توانایی تولید بیوفیلم) گزارش گردید. در ادامه نتایج آزمون کمی تشکیل بیوفیلم نشان داد ۲۹ (۳۵٪) جدایه‌ها بیوفیلم قوی، ۲۵ (۳۰٪) جدایه‌ها بیوفیلم ضعیف و ۲۹ (۳۵٪) جدایه‌ها فاقد توانایی تولید بیوفیلم بودند. در مجموع تعداد ۵۴ جدایه (۶۵٪) به‌عنوان سویه‌های بیوفیلم مثبت در نظر گرفته شدند.

## جدول ۴. مقایسه نتایج تست کمی و کیفی تولید بیوفیلم

تست کمی / تست کیفی	چسبده قوی	چسبده ضعیف	فاقد چسبندگی	جمع کل
کلنی‌های سیاه	۱۷	۶	۰	۲۳
کلنی‌های قرمز تیره	۱۲	۱۹	۰	۳۱
کلنی‌های قرمز روشن	۰	۰	۲۹	۲۹
جمع کل	۲۹	۲۵	۲۹	۸۳

## جدول ۵. مقایسه میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های بیوفیلم مثبت و بیوفیلم منفی استافیلوکوکوس اورئوس

P-value	فراوانی و درصد سویه‌های بیوفیلم منفی (۲۹)	فراوانی و درصد سویه‌های بیوفیلم مثبت (۵۴)	نام آنتی‌بیوتیک
۰/۴۶۵	۲۴ (۸۳٪)	۵۴ (۱۰۰٪) *	پنی‌سیلین
۰/۰۲۶	۲ (۷٪)	۳۳ (۶۱٪)	سیپروفلوکساسین
۰/۱۸۵	۱۸ (۶۲٪)	۴۲ (۷۸٪)	تتراسایکلین
۰/۵۰۵	۱۱ (۳۸٪)	۲۵ (۴۶٪)	کلرامفتیکل
۰/۰۰۷	۲ (۷٪)	۴۰ (۷۴٪)	سفوکسیتین
۰/۰۰۲	-	۳۷ (۱۰۰٪)	جنتامایسین
۰/۰۰۲	-	۳۶ (۱۰۰٪)	اریترومایسین
۰/۰۰۲	-	۲۷ (۱۰۰٪)	سفالوتین
۰/۴۲۷	۱۴ (۴۸٪)	۳۱ (۵۷٪)	آمی‌سیلین
۰/۳۱۵	۶ (۲۱٪)	۱۷ (۳۱٪)	کلیندامایسین
۰/۰۰۲	-	۳۲ (۱۰۰٪)	کوتریموکسازول
-	۱ (۳٪)	۲ (۳٪)	داکسی‌سیلین

\* درصدها گرد شده‌اند.

سویه‌های بیوفیلیم مثبت و بیوفیلیم منفی / استافیلوکوکوس اورئوس با استفاده از آزمون مربع کای مشاهده شد ( $P < 0.05$ )، جدول ۶).

از میان سویه‌های بیوفیلیم مثبت تعداد ۲۴ جدایه (۴۴٪) MRSA بودند؛ کلیه جدایه‌های بیوفیلیم منفی حساس به متی‌سیلین گزارش شدند (جدول ۶). در تجزیه و تحلیل آماری نتایج با سطح اطمینان ۹۵٪، اختلاف آماری معنی‌داری بین نوع سویه و تولید بیوفیلیم با آزمون مربع کای مشاهده گردید ( $P < 0.05$ )  $(X^2=108.1, df=3, P=0.001)$ .

در مقایسه مقاومت چنددارویی و مقاومت به متی‌سیلین در سویه‌های بیوفیلیم مثبت و بیوفیلیم منفی / استافیلوکوکوس اورئوس از مجموع ۸۳ جدایه تأیید شده، ۵۰ جدایه (۶۰٪) دارای مقاومت چنددارویی بود. از مجموع ۵۴ جدایه بیوفیلیم مثبت، تعداد ۴۷ جدایه (۸۷٪) دارای مقاومت چنددارویی، و ۷ جدایه (۱۳٪) فاقد مقاومت چنددارویی بودند. در مقابل تمامی جدایه‌های بیوفیلیم منفی فاقد توان مقاومت چنددارویی بودند (جدول ۶). از نظر مقاومت چنددارویی و مقاومت به متی‌سیلین اختلاف معنی‌داری بین

جدول ۶. مقایسه مقاومت چند دارویی و مقاومت به متی‌سیلین در سویه‌های بیوفیلیم مثبت و بیوفیلیم منفی / استافیلوکوکوس اورئوس

نوع سویه	درصد و فراوانی سویه‌های MDR	درصد و فراوانی سویه‌های non-MDR	درصد و فراوانی MRSA	درصد و فراوانی MSSA
بیوفیلیم مثبت (۵۴)	۴۷ (۸۷٪)	۷ (۱۳٪)	۲۴ (۴۴٪)	۳۰ (۵۶٪)
بیوفیلیم منفی (۲۹)	۰ (۰)	۲۹ (۱۰۰٪)	۰ (۰)	۲۹ (۱۰۰٪)
جمع کل (۸۳)	۴۷ (۵۷٪)	۳۶ (۴۳٪)	۲۴ (۲۹٪)	۵۹ (۷۱٪)

\* درصدها گرد شده‌اند.

مطالعه ژن‌های *icaA* و *icaD* است. از مجموع ۸۳ جدایه، تعداد ۵۰ جدایه (۶۰٪) واجد هر دو ژن *icaA* و *icaD* و تعداد ۳۴ جدایه (۴۱٪) کلیه ژن‌های اپرون را *ica* دارا بودند. از نظر آماری اختلاف معنی‌داری بین حضور ژن‌های اپرون *ica* با یکدیگر در جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس در سطح اطمینان ۹۵٪ وجود نداشت.

### بررسی مولکولی اپرون *icaABCD*

در بررسی مولکولی اپرون *icaABCD* فراوانی حضور ژن *icaA* ۶۷٪/۴ (۵۶ جدایه)، ژن *icaB* ۶۰٪/۲ (۵۰ جدایه)، ژن *icaC* ۶۱٪/۴ (۵۱ جدایه) و ژن *icaD* ۶۲٪/۶ (۵۲ جدایه) در جدایه‌ها گزارش گردید (شکل ۲). بر این اساس شایع‌ترین ژن کدکننده تولید بیوفیلیم در جدایه‌های مورد



شکل ۲. نتایج الکتروفورز محصولات PCR ژن‌های اپرون *ica*.

ستون M- مارکر 100 bp، ستون ۱ و ۲- نمونه‌های مثبت واجد ژن *icaA* (188 bp)، ستون‌های ۳ تا ۵- نمونه‌های مثبت واجد ژن *icaD* (198 bp)، ستون ۶ و ۷- نمونه‌های مثبت واجد ژن *icaC* (1066 bp)، ستون ۸ و ۹- نمونه‌های مثبت واجد ژن *icaB* (880 bp)، ستون ۱۰- کنترل منفی (آب مقطر).

## بحث

بر اساس نتایج مطالعه حاضر شیوع استافیلوکوکوس اورئوس در نمونه‌های بالینی ۴۱/۵٪ گزارش گردید. نتایج مطالعات مختلف در این زمینه شباهت‌ها و اختلافاتی را نشان داد از جمله: Neopane و همکاران در سال ۲۰۱۸ در نپال میزان شیوع استافیلوکوکوس اورئوس از نمونه‌های بالینی را ۲۸/۶۶٪ گزارش کردند (۱۰). در مطالعه دیگری در هند در سال ۲۰۱۸، Manandhar و همکاران میزان شیوع این باکتری از نمونه‌های بالینی ۴۳٪ را گزارش کردند (۲۳). در مطالعه مشابه در تهران که توسط Amini و Mashaieki در سال ۲۰۱۸ انجام گرفت میزان شیوع استافیلوکوکوس اورئوس ۱۷/۰۹٪ محاسبه شد (۲۴). تفاوت شیوع استافیلوکوکوس اورئوس در نمونه‌های بالینی، ممکن است به تفاوت در نوع نمونه، محل جغرافیایی، زمان نمونه‌برداری، محل نمونه‌گیری و غیره مربوط باشد. با توجه به نتایج حاصل از تست آنتی‌بیوگرام در مطالعه حاضر، بیشترین مقاومت جدایه‌ها در آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین (۹۴٪)، تتراسایکلین (۷۲٪)، آمپی‌سیلین (۵۴٪)، سفوکسیتین (متی‌سیلین) (۵۱٪) و جنتامایسین (۳۷٪) گزارش شد. نتایج مطالعه Nourbakhsh و Momtaz در سال ۲۰۱۶ نشان داد بیشترین مقاومت جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس از نمونه‌های بالینی مربوط به پنی‌سیلین (۱۰٪) و تتراسایکلین (۷۶٪) است که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد (۲۵). در مطالعه Sadri و همکاران مقاومت به تتراسایکلین با روش انتشار دیسک ۴۲٪ گزارش گردید (۲۶). همچنین در مطالعه Ahmadi و همکاران مقاومت به جنتامایسین در کرمانشاه ۲۰٪ گزارش گردید. در همین مطالعه میزان مقاومت به آمپی‌سیلین ۵۵٪ گزارش شد (۲۷). مقاومت ۲۳ درصدی سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس به جنتامایسین در مطالعه Hauschild و همکاران نیز مشاهده گردید (۲۸). مطالعه Mirzaee و همکاران در تهران نشان داد بیش از ۸۰٪ جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس به آمپی‌سیلین مقاومت دارند (۲۹).

بررسی‌های مطالعه حاضر نشان‌دهنده شیوع بالای سویه‌های MRSA (۵۱٪) در بخش‌های مختلف بیمارستان‌های آجا است که مقایسه این نتایج، با نتایج مطالعات دیگر در این زمینه، نشان‌دهنده تفاوت و شباهت‌های بسیاری بود. از جمله مطالعه‌ای که توسط Abdollahi و همکاران در سال ۱۳۹۰ در فارس انجام گرفت، میزان مقاومت به متی‌سیلین در جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس ۴۷/۵۶٪ گزارش گردید (۳۰). همچنین مقاومت ۴۳/۵٪ جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس به متی‌سیلین در مطالعه Abu-Shady و

همکاران (۳۱)، شیوع ۱۲/۶٪ MRSA طی مطالعه Tabaei و همکاران (۳۲)، شیوع ۳۰٪ MRSA در مطالعه Rahimi و همکاران (۳۳) و مقاومت ۵۰٪ جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس به متی‌سیلین در مطالعه Hassanzadeh و همکاران در تهران گزارش گردید (۳۴). مقاومت جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس به متی‌سیلین می‌تواند ناشی از استفاده بیش از حد ترکیبات ضد میکروبی برای ضد عفونی کردن محیط‌های بیمارستانی، درمان عفونت‌ها، انتقال بیماران کلونیزه شده با این سویه‌ها از بیمارستانی به بیمارستان دیگر و از این دست عوامل باشد (۲۲). در نتیجه نظارت بیشتر در استفاده از ترکیبات ضد عفونی و داروها، آموزش شیوه‌های صحیح استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها و اقدامات کنترلی عفونت در تمامی بخش‌های بیمارستان‌ها ضروری است.

مطالعات متعددی در خصوص الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس از بخش‌های مختلف بیمارستان‌ها در مناطق مختلف انتشار یافته است که با نتایج مطالعه ما همسو یا ناهمسو بوده‌اند. در مطالعه Ahmadi و همکاران در سال ۲۰۱۴ بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به پنی‌سیلین، تتراسایکلین، متی‌سیلین و آمپی‌سیلین گزارش گردید (۲۷) و همچنین در مطالعه Hatefizade و همکاران در تهران در سال ۱۳۹۵، بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به پنی‌سیلین و آمپی‌سیلین مشاهده شد (۳۵) که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت داشت. در سال ۱۳۹۶ مطالعه‌ای توسط Motamedi و همکاران در همدان انجام شد؛ نتایج مطالعه نشان داد بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به اریترومایسین است (۳۶) که با نتایج مطالعه حاضر مغایر است. از دلایل اختلاف این نتایج می‌توان به تفاوت در منطقه جغرافیایی، الگوی مصرف آنتی‌بیوتیکی (۲۷)، وضعیت بهداشتی بخش‌های مختلف بیمارستانی (۳۴) و همچنین ایجاد مقاومت‌های کروموزومی طی تولید نسل و یا انتقال فاکتورهای مقاومت بین گونه‌های باکتریایی (۳۶)، اشاره کرد.

در مطالعه حاضر علاوه بر تأکید بر گسترش مقاومت چندگانه آنتی‌بیوتیکی در نمونه‌های بالینی، توانایی تولید بیوفیلم به صورت فنوتیپی ۶۵٪ گزارش گردید؛ که با نتایج مطالعات Namvar و همکاران در سال ۲۰۱۳ (۱۳)، Croes و همکاران در سال ۲۰۰۹ (۳۷) مطابقت داشت. همچنین در مطالعه مشابه توسط Gad و همکاران در سال ۲۰۰۹، توانایی تولید بیوفیلم در ۸۳٪ جدایه‌ها گزارش شد (۳۸). در مطالعه دیگری در نپال که توسط Neopane و همکاران در سال ۲۰۱۸ انجام گرفت، سویه‌های مولد بیوفیلم حدود

دو ژن *icaA* و *icaD* در ۶۰٪ جدایه‌ها و در ۴۱٪ جدایه‌ها کلیه ژن‌های اپرون *ica* مشاهده شد اما جدایه‌ها در تشکیل بیوفیلم بین طیف بیوفیلم قوی و ضعیف قرار گرفتند ولی هیچکدام از جدایه‌ها با عدم توانایی تشکیل بیوفیلم دیده نشد.

### نتیجه‌گیری

براساس نتایج مطالعه حاضر، جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* در این مطالعه دارای مقاومت بالایی به اکثر آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه (به ویژه متی‌سیلین) بودند. همچنین فراوانی قابل توجه ژن‌های مولد بیوفیلم در جدایه‌ها می‌تواند در افزایش مقاومت چندگانه، پایداری و ماندگاری بیشتر باکتری در محیط به‌خصوص محیط‌های بیمارستانی موثر باشد. در این مطالعه، از نظر آماری ارتباط معنی‌داری بین ایجاد بیوفیلم و مقاومت آنتی‌بیوتیکی وجود داشت. حضور ژن‌های ایجاد بیوفیلم و نقش آنها در ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی می‌تواند عواقبی همچون بستری شدن طولانی مدت در بیمارستان، افزایش هزینه‌های درمان و افزایش مرگ و میر بیماران (به‌خصوص افراد بستری در بخش سوختگی، افراد دچار نقص ایمنی و افراد تحت درمان‌های تهاجمی مانند استفاده از ایمپلنت‌های مصنوعی)، داشته باشد.

### سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی آجا و پرسنل محترم بیمارستان‌های آجا در تهران، ابراز می‌نمایند.

### تعارض در منافع

این مقاله پژوهشی مستقل است که بدون حمایت مالی سازمانی انجام شده است. در انجام مطالعه حاضر، نویسندگان هیچ‌گونه تضاد منافی نداشته‌اند.

### Referance

1. Foster TJ, O'Reilly M, Patel AH, Bramley AJ. Genetic studies of *Staphylococcus aureus* virulence factors. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 1988; 54(5): 475-82. [DOI:10.1007/BF00461866] [PMID]
2. Oyama T, Miyazaki M, Yoshimura M, Takata T, Ohjimi H, Jimi S. Biofilm-Forming Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Survive in Kupffer Cells and Exhibit High Virulence in Mice. *Toxins*. 2016;8(7):198. [DOI:10.3390/toxins8070198] [PMID] [PMCID]
3. Rahimi F, Katouli M, Karimi S. Biofilm production among methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains

۷۰٪ بودند (۱۰). عوامل مختلفی می‌تواند در تشکیل بیوفیلم موثر باشد، از جمله فاکتورهای محیطی (مانند قندها، یا پروتئازهای موجود در محیط رشد)، در دسترس بودن مواد مغذی، منشاء جغرافیایی، نوع نمونه، سطح ناحیه (خشن یا صاف)، تخلخل، استرس‌های محیطی (مثل در معرض آنتی‌بیوتیک قرار گرفتن)، خصوصیات چسبندگی سطحی و آرایش ژنتیکی باکتری. علاوه بر این موتاسیون در ژن‌های اپرون *ica* و ژن‌های نظارتی این اپرون با کاهش توان *استافیلوکوکوس اورئوس* به‌منظور ایجاد بیوفیلم مرتبط است (۱۰).

در مطالعه حاضر فراوانی حضور ژن *icaA* ۶۷/۴٪ (۵۶ جدایه)، ژن *icaB* ۶۰/۲٪ (۵۰ جدایه)، ژن *icaC* ۶۱/۴٪ (۵۱ جدایه) و ژن *icaD* ۶۲/۶٪ (۵۲ جدایه) در جدایه‌ها بود که با نتایج مطالعه Momtaz و Nourbakhsh در سال ۲۰۱۶ مطابقت دارد (۲۵). در مطالعه Eftekhari و همکاران در سال ۲۰۱۱، ۷۳٪ از نمونه‌ها واجد ژن‌های *icaA* و *icaB* بودند (۲۲). همچنین در مطالعه Namvar و همکاران کلیه جدایه‌ها واجد ژن *icaC* بودند (۱۳). در مطالعه ۶۰٪ از جدایه‌ها واجد هر دو ژن *icaA* و *icaD* و ۴۱٪ جدایه‌ها واجد کلیه ژن‌های اپرون *ica* بودند، این در حالی است که بیوفیلم قوی تنها در ۳۵٪ جدایه‌ها مشاهده گردید. در مطالعه Mirzaee و همکاران در سال ۲۰۱۴ در تهران مشخص گردید که حدوداً ۲۸٪ از این جدایه‌ها توان تشکیل بیوفیلم قوی را داشتند (۲۹). در مطالعه Mashaieki و Amini در سال ۲۰۱۶، ۷۵٪ جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* واجد هر دو ژن *icaA* و *icaD* بودند (۲۴). در بررسی حضور ژن‌ها و تشکیل بیوفیلم به صورت فنوتیپی در جدایه‌ها تفاوت‌هایی مشاهده می‌شود که به عواملی که قبلاً اشاره شد، وابسته است. بنابراین، حضور یا عدم حضور یک ژن به تنهایی نمی‌تواند در تشکیل بیوفیلم نقش اصلی را ایفا کند. در مطالعه حاضر

isolated from catheterized patients with urinary tract infection. *Microb Pathog*. 2016;98:69-76. [DOI:10.1016/j.micpath.2016.06.031] [PMID]

4. Shahmohammadi MR, Nahaei MR, Akbarzadeh A, Milani M. Clinical test to detect *mecA* and antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*, based on novel biotechnological methods. *Artif Cell Nanomed B*. 2016;44(6):1464-8. [DOI:10.3109/21691401.2015.1041639] [PMID]
5. Becker K, Denis O, Roisin S, Mellmann A, Idelevich EA, Knaack D, et al. Detection of *mecA*- and *mecC*-Positive



- Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Isolates by the New Xpert MRSA Gen 3 PCR Assay. *J Clin Microbiol.* 2016; 54(1): 180-4. [DOI:10.1128/JCM.02081-15] [PMID] [PMCID]
6. Havaei SA, Assadbeigi B, Esfahani BN, Hoseini NS, Rezaei N, Havaei SR. Detection of *mecA* and enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates associated with bovine mastitis and characterization of *Staphylococcal cassette chromosome mec* (SCCmec) in MRSA strains. *Iran J Microbiol.* 2015; 7(3): 161-7.
  7. Federman C, Ma C, Biswas D. Major Components of Orange Oil Inhibit *Staphylococcus aureus* Growth and Biofilms Formation, and Alter Its Virulence Factors. *J Med Microbiol.* 2016; 65(7): 688-695. [DOI:10.1099/jmm.0.000286] [PMID]
  8. Thilakavathy P, Priyan RM, Jagatheeswari PA, Charles J, Dhanalakshmi V, Lallitha S, et al. Evaluation of *Ica* Gene in Comparison with Phenotypic Methods for Detection of Biofilm Production by Coagulase Negative *Staphylococci* in a Tertiary Care Hospital. *J Clin Diagn Res.* 2015; 9(8): 16-9. [DOI:10.7860/JCDR/2015/11725.6371] [PMID] [PMCID]
  9. Tyner H, Patel R. *Propionibacterium acnes* biofilm - A sanctuary for *Staphylococcus aureus*. *Anaerobe.* 2016; 40: 63-7. [DOI:10.1016/j.anaerobe.2016.05.014] [PMID]
  10. Neopane P, Prasad Nepal H, Shrestha R, Uehara O, Abiko Y. In Vitro Biofilm Formation by *Staphylococcus aureus* Isolated From Wounds of Hospital-admitted Patients and Their Association With Antimicrobial Resistance. *Int. J Gen Med.* 2018; 11: 25-32. [DOI:10.2147/IJGM.S153268] [PMID] [PMCID]
  11. Costa MO, Beltrame CO, Ferreira FA, Botelho AM, Lima NC, Souza RC, et al. Complete Genome Sequence of a Variant of the Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* ST239 Lineage, Strain BMB9393, Displaying Superior Ability to Accumulate *ica*-Independent Biofilm. *Genome Announc.* 2013;1(4). [DOI:10.1128/genomeA.00576-13] [PMID] [PMCID]
  12. Naicker PR, Karayem K, Hoek KG, Harvey J, Wasserman E. Biofilm Formation in Invasive *Staphylococcus aureus* Isolates is Associated With the Clonal Lineage. *Microb Pathog.* 2016; 90: 41-9. [DOI:10.1016/j.micpath.2015.10.023] [PMID]
  13. Namvar AE, Asghari B, Ezzatifar F, Azizi G, Lari AR. Detection of the Intercellular Adhesion Gene Cluster (*ica*) in Clinical *Staphylococcus aureus* Isolates. *GMS Hyg Infect Control.* 2013; 8(1): 03.
  14. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Medical Microbiology E-Book.* Elsevier Health Sciences; 2020 Apr 26.
  15. Pa W. *Clinical and Laboratory Standard Institute C. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically Approved Standard M7-A7 Clinical and Laboratory Standard Institute.* 2006.
  16. Doebbeling B. The Epidemiology of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Colonisation and Infection. *J Chemother.* 1995; 7(3): 99-103.
  17. Silva G, Kantzanou M, Justice A, Massey RC, Wilkinson AR, Day N, Peacock SJ. 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; 40(2): 382-8. [DOI:10.1128/JCM.40.02.382-388.2002] [PMID] [PMCID]
  18. Christensen GD, Simpon WA, Younger JJ, Baddour LM, Barrett FF, Meleton DM, et al. Adherence of Coagulase-Negative *Staphylococci* to Plastic Tissue Culture Plates: a Quantitative Model for the Adherence of *Staphylococci* to Medical Devices. *J Clin Microbiol.* 1985; 22(6): 996-1006. [DOI:10.1128/JCM.22.6.996-1006.1985] [PMID] [PMCID]
  19. Udo R, Hans-Jörg L, Michaela M, Birgit L, Norbert L. Rapid Identification of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and Simultaneous Species Confirmation Using Real-Time Fluorescence PCR. *J. Clin. Microbiol.* 2000 38(6): 2429-2433. [DOI:10.1128/.38.6.2429-2433.2000] [PMID] [PMCID]
  20. Zhang K, Sparling J, Chow BL, Elsayed S, Hussain Z, Church DL, et al. New Quadriplex PCR Assay for Detection of Methicillin and Mupirocin Resistance and Simultaneous Discrimination of *Staphylococcus aureus* from Coagulase-negative *Staphylococci*. *Journal of Clinical Microbiology.* 2004; 42(11): 4947-55. [DOI:10.1128/JCM.42.11.4947-4955.2004] [PMID] [PMCID]
  21. Piechota M, Kot B, Frankowska-Maciejewska A, Grużewska A, Woźniak-Kosek A. Biofilm formation by methicillin-resistant and methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* strains from hospitalized patients in Poland. *Biomed Res. Int.* 2018 Dec 27;2018. [DOI:10.1155/2018/4657396] [PMID] [PMCID]
  22. Eftekhari F, Dadaei T. Biofilm Formation and Detection of *icaAB* Genes in Clinical Isolates of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*. *Iran J Basic Med Sci.* 2011; 14(2):132-6.
  23. Manandhar S, Singh A, Varma A, Pandey S, Shrivastava N. Evaluation of methods to detect in vitro biofilm formation by *staphylococcal* clinical Isolates. *BMC Res Notes.* 2018; 11: 714. [DOI:10.1186/s13104-018-3820-9] [PMID] [PMCID]
  24. Mashaieki S, Amini K. Antibiotic resistance pattern and biofilm production in *Staphylococcus aureus* isolates and *Staphylococcus epidermidis* isolated from hospital infections Tehran in 2016. *J Birjand Uni Med Sci.* 2018; 25(2): 160-166.
  25. Nourbakhsh F, Momtaz H. Evaluation of Phenotypic and Genotypic Biofilm Formation in *Staphylococcus aureus* Isolates Isolated from Hospital Infections in Shahrekord, 2015. *AMUJ.* 2016; 19(109): 69-79.

26. Sadri H, Owlia P, Shahrbanoie R. Vancomycin resistance among clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Arch Iranian Med*. 2005; 8(2): 100-103.
27. Ahmadi Z, Tajbakhsh E, Momtaz H. Detection of the antibiotic resistance pattern in *Staphylococcus aureus* isolated from clinical samples obtained from patients hospitalized in Imam Reza hospital, Kermanshah. *J Microb World*. 2014; 6(4): 299-311.
28. Hauschild T, Sacha P, Wiczorek P, Zalewska M, Kaczyńska K, Tryniszewska E. Aminoglycosides resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* from a University Hospital in Bialystok, Poland. *Folia Histochem Cytobiologica*. 2008; 46(2): 225-228. [[DOI:10.2478/v10042-008-0034-3](https://doi.org/10.2478/v10042-008-0034-3)] [[PMID](#)]
29. Mirzaee M, Najar-Peerayeh S, Behmanesh M, Forouzandeh Moghadam M, Ghasemian AM. Biofilm Formation and Presence of *ica* Genes in *Staphylococcus aureus* Isolated from Intensive Care Unit. *J Mazandaran Univ Med Sci*. 2014; 24(115): 43-51.
30. Abdollahi A, Kouhpaye SA, Najafipour S, Mansouri Y, Abdollahi Kherabadi S, Jafari S. Frequency of drug resistance and staphylococcal chromosomal cassette *mec* (*SCCmec*). Genotype in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Behdad, Scientific and Research Journal of Alborz Medical Sciences*. 2012;1(1):47-52.
31. Abu-Shady HM, El-Essawy AK, Salama MS, El-Ayesh AM. Detection and molecular characterization of vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* from clinical isolates. *African J of Biotech*. 2012; 11(99): 494-503.
32. Tabaei S, Noghondar MK, Mohammadzadeh M, Ataei L, Amel Jamehdar S. Pattern of antibiotic resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains isolated from clinical specimens: Imam Reza hospital in Mashhad. *Med J Mashhad Uni Med Sci*. 2016; 59(2): 64-70.
33. Rahimi F, Bouzari M, Katouli M, Pourshafie MR. Antibiotic resistance pattern of methicillin resistant and methicillin sensitive *staphylococcus aureus* isolates in Tehran, Iran. *Jundishapur J Microbiol*. 2013; 6:144-149. [[DOI:10.5812/jjm.4896](https://doi.org/10.5812/jjm.4896)]
34. Hassanzadeh S, Pourmand MR, Hadadi A, Nourijeylani K, Yousefi M, Mashhadi R. Frequency and antimicrobial resistance patterns of methicillin resistant *staphylococcus aureus* in Tehran. *J Med Bacteriol*. 2013; 2: 41-46.
35. Hatefizade B, Hosseini F, Moradi Bidhendi S. Study of some of antiseptic drugs on *Staphylococcal* strains biofilm isolated from patients with infectious skin during 2014-2015 in Tehran city. *Razi J Med Sci*. 2016; 23(148): 128-135.
36. Motamedi H, Asghari B, Tahmasebi H, Arabestani MR. Adhesion Factors and Association with Antibiotic Resistance among Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus*. *Iran J Med Microbiol*. 2017; 11 (3): 27-36
37. 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. [[DOI:10.1186/1471-2180-9-229](https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-229)] [[PMID](#)] [[PMCID](#)]
38. Gad GF, El-Feky MA, El-Rehewy MS, Hassan MA, Abolella H, El-Baky R. M. 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. [[DOI:10.3855/jidc.241](https://doi.org/10.3855/jidc.241)] [[PMID](#)]