

مقایسه فنوتایپی تشکیل بیوفیلیم در میان سویه های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از بیماران در تهران و اصفهان

نرگس سادات مصطفوی^۱، فاطمه محقق^۱، فاتح رحیمی^۲*

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی-میکروبهای بیماریزا، بخش میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوریهای زیستی، دانشگاه اصفهان

۲- دکتری تخصصی باکتری شناسی، دانشیار بخش میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوریهای زیستی، دانشگاه اصفهان

*نشانی برای مکاتبه: اصفهان، خیابان هزار جریب، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم و فناوریهای زیستی، بخش میکروبیولوژی
f.rahimi@sci.ui.ac.ir

پذیرش برای چاپ: بهمن نود و نه

دریافت مقاله: مرداد نود و نه

چکیده

زمینه و هدف: استافیلوکوکوس اورئوس یک عامل بیماریزای مهم در ایجاد طیف وسیعی از عفونتهای بالینی شناخته می شود که با تشکیل بیوفیلیم می تواند باعث ایجاد الگوهای مقاومتی جدید و شکست در روند درمان گردد. این مطالعه با هدف بررسی مقایسه فنوتایپی تشکیل بیوفیلیم در میان سویه های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از بیماران در شهرهای تهران و اصفهان انجام گرفت. روش کار: در مجموع در طی سال ۱۳۹۶، به ترتیب ۱۱۵ و ۱۱۹ جدایه مشکوک به استافیلوکوکوس اورئوس از بیماران مبتلا به عفونتهای مختلف از آزمایشگاه یک بیمارستان مرجع در هر یک از شهرهای تهران و اصفهان جمع آوری شدند و با استفاده از آزمون PCR مورد شناسایی و تأیید قرار گرفتند. به منظور تعیین توانایی تشکیل بیوفیلیم از آزمونهای کیفی ژلوز قرمز کنگو و کمی میکروتیتر پلیت استفاده گردید.

یافته ها: با استفاده از آزمون PCR با پرایمرهای اختصاصی ژن *nuca* تمامی ۲۳۴ جدایه جمع آوری شده به عنوان سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مورد تأیید قرار گرفتند. بر اساس نتایج حاصل از آزمون کیفی ژلوز قرمز کنگو به ترتیب ۱۲ و ۸ درصد سویه های استافیلوکوکوس اورئوس جداسازی شده از شهرهای اصفهان و تهران واجد کلنیهای سیاه رنگ و اسلایم مثبت بودند. همچنین، در آزمون میکروتیتر پلیت نیز ۱۲ و ۷ درصد سویه ها در شهرهای اصفهان و تهران مولد بیوفیلیم قوی بودند. در مجموع، ۹۷ درصد سویه ها در هر دو شهر قادر به تشکیل بیوفیلیم قوی و متوسط بودند.

نتیجه گیری: بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه می توان ادعا داشت که روش کمی میکروتیتر پلیت در مقایسه با روش کیفی ژلوز قرمز کنگو از حساسیت و اختصاصیت بیشتری جهت سنجش بیوفیلیم برخوردار می باشد. از طرف دیگر، شیوع بالای سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مولد بیوفیلیم در شهرهای تهران و اصفهان یک هشدار و تهدید جدی برای سلامت جامعه محسوب می شود.

واژگان کلیدی: استافیلوکوکوس اورئوس، بیوفیلیم، بیماران، میکروتیتر پلیت، ژلوز قرمز کنگو

مقدمه

پوست و بافتهای نرم، ذات الریه، استئومیلیت، اندوکاردیت، سپتی سمی و عفونتهای مرتبط با ابزارهای خارجی نظیر شانت، سوند و ونتیلاتورهای مکانیکی را دارد (۳ و ۲). به طور کلی توانایی ایجاد عفونتهای مزمن توسط استافیلوکوکوس اورئوس به دلیل توانایی این باکتری در اتصال به سطوح مختلف و ایجاد جمعیتی از سلولهای محصور شده توسط ماتریکسی به نام بیوفیلیم می باشد که به بقای باکتری و همچنین مقاومت آن در برابر عوامل ضد میکروبی کمک می

استافیلوکوکوس اورئوس یک باکتری گرم مثبت است که به عنوان میکروفلور طبیعی پوست و غشاهای مخاطی در بینی و بخش فوقانی دستگاه تنفس در انسان و گونه های مختلف جانوری حضور دارد (۱). استافیلوکوکوس اورئوس، یک باکتری همزیست با انسان و همچنین باکتری بیماریزایی است که تقریباً ۳۰ درصد از جمعیت جهان توسط این باکتری کلونیزه می شوند. این باکتری مهمترین باکتری بیماریزای بیمارستانی است که قابلیت ایجاد انواعی از عفونتها از جمله عفونتهای

روش کار

در طی سال ۱۳۹۶ در مجموع ۲۳۴ جدایه مشکوک به استافیلوکوکوس اورئوس از یک بیمارستان مرجع در هر یک از شهرهای تهران (۱۱۵، ۴۹ درصد) و اصفهان (۱۱۹، ۵۱ درصد) به صورت هفتگی جمع آوری شدند و به آزمایشگاه باکتری شناسی (nkn دانشگاه اصفهان منتقل شدند. تمامی جدایه ها در ابتدا بر روی محیط کشت ژلوز مغذی (Biolife, Italy) کشت داده شدند و پس از خالص سازی جهت انجام مطالعات بیشتر در لوله های کرایو واجد آبگوشت مغذی (Biolife, Italy) و گلیسرول در فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند. جهت شناسایی جدایه ها در این مطالعه از آزمون PCR استفاده گردید (۵).

به منظور استخراج DNA ۲۳۴ سویه جمع آوری شده در شهرهای تهران و اصفهان از روش جوشاندن بر اساس دستورالعمل رحیمی و همکاران استفاده گردید [۱۰]. بر این اساس، تعداد کمی کلنی باکتری در ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل حل و به خوبی ورتکس گردید. سپس وبالها به مدت ۲۰ دقیقه در دستگاه ترموبلاک (Biometra, Germany) در دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد قرار گرفتند و پس از ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ در ۱۴۰۰× g از مایع رویی به عنوان الگوی DNA در آزمون PCR استفاده گردید.

جهت انجام آزمون PCR به منظور شناسایی جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس از دستورالعمل پیشین بر اساس شناسایی ژن *nucA* که توسط رحیمی و همکاران بهینه سازی شده بود استفاده گردید [۵]. مخلوط واکنش و چرخه حرارتی نیز جهت انجام آزمون PCR بر اساس دستورالعمل رحیمی و همکاران بود.

بر اساس دستورالعمل رحیمی و همکاران، در ابتدا باکتریها به صورت خطی بر روی محیط ژلوز قرمز کنگو کشت داده شدند و سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری شدند. سپس، کلنیهای باکتریایی بر روی محیط ژلوز قرمز کنگو بر اساس ظهور رنگهای مشکی، قرمز تیره و قرمز روشن به ترتیب به عنوان سویه های اسلایم مثبت (بیوفیلیم مثبت)، اسلایم کاذب (بیوفیلیم مشکوک) و اسلایم منفی (بیوفیلیم منفی) تقسیم بندی شدند (۱۰).

جهت بررسی کمی توانایی باکتریها برای اتصال و تشکیل بیوفیلیم، از روش میکروتیتر پلیت مبتنی بر کریستال ویوله بر اساس دستورالعمل رحیمی و همکاران استفاده شد [۱۰]. برای این منظور، تمامی سویه ها در ابتدا در محیط آبگوشت تریپتیک سوی (Scharlau, Spain) واجد ۰/۲۵ درصد

کند و باعث ایجاد مشکلی جدی در سلامت انسان می شود (۴). اگرچه آنتی بیوتیکهایی جهت کنترل این عفونتها مورد استفاده قرار می گیرند، اما گزارشهای زیادی در رابطه با ظهور سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به چند دارو (Multi drug resistant: MDR) خصوصاً در میان بیماران بستری شده در بیمارستان وجود داشته است که استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین (Methicillin resistant Staphylococcus aureus: MRSA)، عامل اصلی در ایجاد عفونت از طریق تشکیل بیوفیلیم در جامعه و بیمارستان محسوب می شود (۳و۵).

تشکیل بیوفیلیم شامل ۳ مرحله اصلی است: اتصال، بلوغ و پراکندگی سلولهای باکتریایی (۱). تولید بیوفیلیم ناشی از فعالیت اپرون *icaADBC* است که مهمترین عامل برای تشکیل ماتریکس اگزوپلی ساکاریدی بوده و از عوامل چسبندگی بین سلولی (PIA) یا پلی N-استیل گلوکز آمین (PNAG) در نظر گرفته می شود که در چسبندگی سلول به سلول نقش دارد و تشکیل بیوفیلیم را تسهیل می کند (۶و۷). مقاومت ضد میکروبی در بین سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین، به دلیل تولید پروتئین اتصال دهنده پنی سیلین (*PBP2a*) است که توسط ژن *mecA* در کاست کروموزومی ژن *mec* (*SCCmec*) رمزگذاری می شود. بنابراین حضور این ژنها باعث مقاومت به آنتی بیوتیکهای متعددی به ویژه آنتی بیوتیکهای بتا-لاکتام می گردد که موقعیت مناسبی را برای سلولهای باکتریایی فراهم می کند (۷و۱). مشخص شده است که حذف و ریشه کنی عفونتهای بیوفیلیمی بسیار دشوار است و در مقایسه با سلولهای پلانکتونی ۱۰ تا ۱۰۰۰ برابر تحمل بیشتری نسبت به مواد ضد میکروبی نشان می دهند (۸). روشهای آزمایشگاهی مختلفی جهت سنجش تولید بیوفیلیم در باکتریها معرفی شده اند که در این میان روشهای کیفی ژلوز قرمز کنگو و کمی میکروتیتر پلیت به طور گسترده ای جهت تشخیص فنونایپی سویه های مولد بیوفیلیم مورد استفاده قرار می گیرند (۹). این مطالعه با هدف مقایسه فنونایپی تشکیل بیوفیلیم در میان سویه های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از بیماران در شهرهای تهران و اصفهان در سال ۱۳۹۶ انجام گرفته است.

یافته ها

بر اساس نتایج حاصل از آزمون PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن *nucA* تمامی ۲۳۴ جدایه جمع آوری شده از آزمایشگاه های دو بیمارستان مورد مطالعه به عنوان سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد شناسایی قرار گرفتند و نتایج حاصل از شناسایی با استفاده از آزمون مولکولی تأیید کننده نتایج شناسایی سویه ها با استفاده از آزمونهای معمول بیوشیمیایی در آزمایشگاه های بیمارستانهای مورد مطالعه بود.

بر این اساس مشخص گردید که از مجموع ۲۳۴ سویه مورد بررسی ۱۰۰ سویه واجد کلنیهای سیاه رنگ و قرمز تیره بودند، که از این تعداد ۲۳ سویه (۱۰ درصد) واجد کلنیهای مشکی رنگ بودند که به عنوان سویه های اسلایم مثبت انتخاب گردیدند. همچنین ۷۷ سویه (۳۳ درصد) نیز واجد کلنیهای قرمز تیره بودند و به عنوان سویه های اسلایم کاذب و بیوفیلم مشکوک تعیین گردیدند. علاوه بر این فراوانی سویه های اسلایم مثبت و اسلایم کاذب در تهران بیشتر از اصفهان بود؛ اما این اختلاف معنی دار نبود ($P=0/3$). شیوع سویه های اسلایم مثبت، اسلایم منفی و اسلایم کاذب در تهران به ترتیب ۹ سویه (۸ درصد)، ۶۱ سویه (۵۳ درصد) و ۴۵ سویه (۳۹ درصد) و در اصفهان به ترتیب ۱۴ سویه (۱۲ درصد)، ۷۳ سویه (۶۱ درصد) و ۳۲ سویه (۲۷ درصد) بود.

گلوز کشت داده شده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری شدند. سپس با تهیه رقت ۰/۰۱ از کشت هر سویه به صورت سه تایی در چاهکهای پلی استیرین پلیتھا به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری شدند و پس از این مدت سه مرتبه شستشو با PBS انجام گرفت. در ادامه چاهکها با استفاده از کریستال ویوله ۰/۳ درصد به مدت ۵-۱۰ دقیقه رنگ آمیزی شده و در نهایت رنگهایی که به بیوفیلم متصل بودند توسط اتانول:استون حل شدند و جذب نوری هر یک از چاهکها در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه خوانشگر الیزا ثبت گردید. بر این اساس، اگر جذب نوری سویهها $1 <$ بود به عنوان بیوفیلم قوی و اگر جذب نوری کمتر از جذب نوری کنترل بود به عنوان بیوفیلم منفی تقسیم بندی شدند. همچنین، اگر $1 <$ جذب نوری $0/2 <$ بود سویه ها به عنوان بیوفیلم متوسط و اگر $0/2 <$ جذب نوری بود سویه ها به عنوان بیوفیلم ضعیف در نظر گرفته شدند (۱۱). جهت انجام محاسبات آماری در این مطالعه از نرم افزار GraphPad Prism 5 و آزمون آماری Fisher's exact استفاده گردید.

جدول ۱. بررسی تشکیل بیوفیلم در میان سویه های استافیلوکوکوس اورئوس به روش کیفی ژلوز قرمز کنگو.

شهر	اسلایم مثبت (درصد)	اسلایم کاذب (درصد)	اسلایم منفی (درصد)	مجموع (درصد)
تهران	۹ (۸)	۴۵ (۳۹)	۶۱ (۵۳)	۱۱۵ (۴۹)
اصفهان	۱۴ (۱۲)	۳۲ (۲۷)	۷۳ (۶۱)	۱۱۹ (۵۱)
مجموع (درصد)	۲۳ (۱۰)	۷۷ (۳۳)	۱۳۴ (۵۷)	۲۳۴
P value	۰/۴۸	۰/۰۹	۰/۳	۰/۸

۱۰۳ سویه (۸۹ درصد) و در شهر اصفهان به ترتیب ۱۴ سویه (۱۰ درصد) و ۱۰۳ سویه (۸۶ درصد) بود و هیچکدام از سویه ها قادر به تشکیل بیوفیلیم ضعیف نبودند. علاوه بر این، اختلاف معنی داری بین سویه ها از نظر توانایی تشکیل بیوفیلیم بین سویه های جداسازی شده از شهرهای تهران و اصفهان مشاهده نشد.

بر اساس نتایج حاصل از آزمون کمی میکروتیتر پلیت مشخص گردید که در مجموع در میان ۲۳۴ سویه مورد بررسی، ۲۲۸ سویه (۹۷ درصد) مولد بیوفیلیم (قوی و متوسط) بودند و تنها ۳ درصد سویه ها (۶ سویه) قادر به تشکیل بیوفیلیم نبودند (جدول ۲). در این میان، فراوانی سویه های بیوفیلیم قوی و بیوفیلیم متوسط در شهر تهران به ترتیب ۸ سویه (۷ درصد) و

جدول ۲. بررسی تشکیل بیوفیلیم میان سویه های استافیلوکوکوس اورئوس به روش کمی میکروتیتر پلیت.

شهر	بیوفیلیم قوی (درصد)	بیوفیلیم متوسط (درصد)	بیوفیلیم منفی (درصد)	مجموع (درصد)
تهران	۸ (۷)	۱۰۳ (۸۹)	۴ (۴)	۱۱۵ (۴۹)
اصفهان	۱۴ (۱۲)	۱۰۳ (۸۶)	۲ (۲)	۱۱۹ (۵۱)
مجموع (درصد)	۲۲ (۱۰)	۲۰۶ (۸۷)	۶ (۳)	۲۳۴
P value	۰/۳۳	۰/۶۶	۰/۶۸	۰/۸۸

بحث

یک آزمون استاندارد برای تشخیص مستقیم تولید پلی ساکراید استفاده می گردد و به علت اندازه گیری اسپکتروفتومتری، اطلاعات کمی را در اختیار ما قرار می دهد (۱۰ و ۱۴). در مطالعه حاضر با استفاده از روش میکروتیتر پلیت یک طبقه بندی کمی و ساده از سویه های استافیلوکوکوی ایجاد گردید؛ به این صورت که با بررسی نتایج حاصل از قرائت جذب نوری پلیتها در طول موج ۵۷۰ نانومتر، درصد باکتریهای مولد بیوفیلیم در هر یک از شهرهای تهران و اصفهان محاسبه گردید که در این مطالعه با یکدیگر همخوانی داشتند. در روش کشت در محیط ژلوز قرمز کنگو درصد بالایی از سویه ها از نظر عدم توانایی تولید بیوفیلیم (اسلایم منفی) تشخیص داده شدند که به ترتیب در تهران ۵۳ درصد و در اصفهان ۶۱ درصد بود. این اختلاف در دو آزمون میکروتیتر پلیت و ژلوز قرمز کنگو می تواند ناشی از تأثیر پذیری نتایج از شرایط رشد باکتری و یا خطای دید باشد (۱۵). مقایسه نتایج آزمونهای میکروتیتر پلیت و ژلوز قرمز کنگو مؤید این نکته بود که آزمون میکروتیتر پلیت در مقایسه با روش ژلوز قرمز کنگو جهت سنجش تولید بیوفیلیم روش بهتر و مطمئن تری است و از حساسیت و اختصاصیت بالاتری جهت شناسایی سویه های

اتصال و سپس رشد بیوفیلیم در یک سطح با تغییرات مهمی در ژن، بیان پروتئین و فعالیت متابولیکی همراه است که موجب مقاومت نسبت به درمان، مواد ضد میکروبی و همچنین سازوکار پاکسازی توسط میزبان می شود (۱۲). بنابراین توانایی تشکیل بیوفیلیم توسط استافیلوکوکوس اورئوس نه تنها به حضور باکتری در میزبان کمک می کند، بلکه در ایجاد عفونتهای مزمن و مقاوم نیز نقش دارد. همچنین؛ در سالهای اخیر، افزایش نگران کننده ای در شیوع مقاومت نسبت به متی سیلین و کاهش حساسیت نسبت به ونکومایسین در میان سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مشاهده گردیده است (۹ و ۱۳).

در مطالعه حاضر از ترکیب دو آزمون کمی میکروتیتر پلیت و کیفی ژلوز قرمز کنگو جهت بررسی توانایی تشکیل بیوفیلیم در میان سویه های استافیلوکوکوس اورئوس جداسازی شده از بیماران در شهرهای تهران و اصفهان استفاده گردید. با وجود اینکه در حال حاضر روشهای متعددی جهت سنجش توانایی تشکیل بیوفیلیم در میان سویه های باکتریایی مورد استفاده قرار می گیرند، اما آزمون میکروتیتر پلیت یکی از روشهای پرکاربرد برای سنجش تشکیل بیوفیلیم می باشد که به عنوان

مطالعه Nourbakhsh و Namvar، تنها ۸/۸۶ درصد سویه های جداسازی شده از عفونتهای بالینی در استان اصفهان قادر به تشکیل بیوفیلم بودند که کمتر از نتایج مطالعه حاضر بود (۱۸).

نتیجه گیری

استافیلوکوکوس اورئوس به عنوان یک عامل شایع در عفونتهای بیمارستانی و اکتسابی از جامعه شناخته می شود و به دلیل توانایی تولید بیوفیلم از اهمیت بسیار زیادی برخوردار می باشد. این تجمعات باکتریایی به صورت بیوفیلم منجر به ایجاد مقاومت نسبت به آنتی بیوتیکها شده و درمان را با مشکل مواجه می سازد. این مقاومت ایجاد شده به خصوص در محیطهای بیمارستانی می تواند تهدید بزرگی برای بیماران خصوصاً بیماران مبتلا به نقص ایمنی باشد و باعث افزایش میزان مرگ و میر در میان بیماران می شود. در مطالعه حاضر فراوانی تولید بیوفیلم در میان سویه های استافیلوکوکوس اورئوس جداسازی شده از عفونتهای بالینی در شهرهای تهران و اصفهان نسبتاً بالا و تقریباً مشابه است بنابراین شیوع بالای سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مولد بیوفیلم یک خطر و تهدید جدی برای بیماران مراجعه کننده و بستری در بیمارستانهای مورد بررسی محسوب می شود.

تقدیر و تشکر

این مطالعه با حمایت مالی معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه اصفهان به انجام رسیده است.

مولد بیوفیلم و سویه های بیوفیلم منفی برخوردار می باشد (۹). در مطالعه Mathur و همکاران، ۴۷/۱۴ درصد از سویه های بالینی استافیلوکوکوس قادر به تشکیل بیوفیلم قوی بودند (۱۶). همچنین، در مطالعه‌ای که توسط Puja و همکاران صورت گرفت، ۶/۷۹ درصد از سویه های جداسازی شده از زخم و چرک قابلیت تشکیل بیوفیلم قوی با چسبندگی بالا داشتند که به ترتیب با نتایج به دست آمده در شهرهای اصفهان و تهران در مطالعه حاضر همخوانی دارند (۱۷). بر اساس نتایج حاصل از یک تحقیق صورت گرفته در آفریقای جنوبی ۳۷/۸ درصد از سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین جداسازی شده قادر به تولید بیوفیلم بودند (۱۵).

در مطالعه رحیمی و همکاران بر روی سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین مولد بیوفیلم جداسازی شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری و واجد سوند در تهران، از میان ۱۰۸ سویه مورد بررسی، با استفاده از آزمون کیفی ژلوز قرمز کنگو ۹۴ درصد توانایی تشکیل بیوفیلم داشتند و در آزمون کمی میکروتیتر پلیت، ۱۵ درصد از سویه ها بیوفیلم قوی و ۶۲ درصد بیوفیلم متوسط تشکیل دادند (۱۰). نتایج حاصل از این مطالعه با تحقیق صورت گرفته توسط رحیمی و همکاران تقریباً تطابق دارد. همچنین، در

REFERENCES

1. Bissong MEA, Ateba CN. Genotypic and phenotypic evaluation of biofilm production and antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from milk, North West Province, South Africa. *Antibiotics*. 2020;9(4):156.
2. Tong SY, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clinical Microbiology Reviews*. 2015;28(3):603-61.
3. Gowrishankar S, Kamaladevi A, Balamurugan K, Pandian SK. In vitro and in vivo biofilm characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from patients associated with pharyngitis infection. *BioMed Research International*. 2016;2016.
4. Kiedrowski MR, Horswill AR. New approaches for treating staphylococcal biofilm infections. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2011;1241(1):104-21.
5. Rahimi F, Katouli M, Pourshafie MR. Characteristics of hospital-and community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Tehran, Iran. *Journal of Medical Microbiology*. 2014;63(6):796-804.
6. McCarthy H, Rudkin JK, Black NS, Gallagher L, O'Neill E, O'Gara JP. Methicillin resistance and the biofilm phenotype in *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2015;5:1.
7. Manandhar S, Singh A, Varma A, Pandey S, Shrivastava N. Biofilm producing clinical *Staphylococcus aureus* isolates augmented prevalence of antibiotic resistant cases in tertiary care hospitals of Nepal. *Frontiers in Microbiology*. 2018;9:2749.
8. Olsen I. Biofilm-specific antibiotic tolerance and resistance. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2015;34(5):877-86.
9. Melo PdC, Ferreira LM, Nader Filho A, Zafalon LF, Vicente HIG, Souza Vd. Comparison of methods for the detection of biofilm formation by *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2013;44(1):119-24.
10. Rahimi F, Katouli M, Karimi S. Biofilm production among methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from catheterized patients with urinary tract infection. *Microbial Pathogenesis*. 2016;98:69-76.
11. Wang L, Li M, Dong D, Bach T-HL, Sturdevant DE, Vuong C, et al. SarZ is a key regulator of biofilm formation and virulence in *Staphylococcus epidermidis*. *The Journal of Infectious Diseases*. 2008;197(9):1254-62.

12. Sanchez CJ, Mende K, Beckius ML, Akers KS, Romano DR, Wenke JC, et al. Biofilm formation by clinical isolates and the implications in chronic infections. *BMC Infectious Diseases*. 2013;13(1):47.
13. Yousefi M, Pourmand MR, Fallah F, Hashemi A, Mashhadi R, Nazari-Alam A. Characterization of *Staphylococcus aureus* biofilm formation in urinary tract infection. *Iranian Journal of Public Health*. 2016;45(4):485.
14. Moghadam SO, Pourmand MR, Aminharati F. Biofilm formation and antimicrobial resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from burn patients, Iran. *The Journal of Infection in Developing Countries*. 2014;8(12):1511-7.
15. Moori-Bakhtiari N, Moslemi M. Phenotypic evaluation of biofilm producing ability in methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *KAUMS Journal (FEYZ)*. 2017;20(6):525-31.
16. Mirzaee M, Najar-Peerayeh S, Behmanesh M, Forouzandeh-Moghadam M, Ghasemian A-M. Detection of intracellular adhesion (*ica*) gene and biofilm formation *Staphylococcus aureus* isolates from clinical blood cultures. *Journal of Medical Bacteriology*. 2014;3(1-2):1-7.
17. Neopane P, Nepal HP, 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. *International Journal of General Medicine*. 2018;11:25.
18. Nourbakhsh F, Namvar AE. Detection of genes involved in biofilm formation in *Staphylococcus aureus* isolates. *GMS Hygiene and Infection Control*. 2016;11.