View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by Repository of Research and Investigative Information

مقاله تحقیقی

مجله دانشگاه علوم پزشکی بابل
دوره بیستم، شمارهٔ ۶، خرداد ۱۳۹۷، صفحه ۳۵-۲۷

ژن‌های چسبندگی بین‌سلولی (*ica*) مرتبط با تشکیل بیوفیلم و اسلایم در ایزوله‌های بالینی *استافیلوکوکوس اورئوس* حامل ژن *mecA*

ندا یوسفی نوجوکامبری (MSc)[۱]، سجاد یزدان‌ستاد (PhD)[۲و۳*]، عبدالله اردبیلی (PhD)[۲و۳]، مرتضی صاکی (PhD)[۴و۵]، احسان نجاری (MSc)[۲و۳]

۱- مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرمسیری، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۲- مرکز تحقیقات علوم آزمایشگاهی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران
۳- گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران
۴- گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران
۵-کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران

دریافت: ۹۶/۴/۵، اصلاح: ۹۶/۷/۲۵، پذیرش: ۹۷/۱/۱۵

خلاصه

سابقه و هدف: شیوع سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین یکی از مهم‌ترین مشکلات بهداشتی و تهدید کنندهٔ سلامت در سراسر دنیا است. این سویه‌ها با توانایی تشکیل بیوفیلم و اسلایم، قابلیت کلونیزاسیون و انتقال بیشتری را دارند. مطالعهٔ حاضر بمنظور بررسی حضور ژن‌های *icaA* و *icaD* و تشکیل بیوفیلم و اسلایم در ایزوله‌های بالینی *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین حامل ژن *mecA* انجام گرفت.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، مقطعی تعداد ۸۵ باکتری مشکوک به *استافیلوکوکوس اورئوس* از نمونه‌های بالینی بیماران جداسازی شد. آزمون تعیین حساسیت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین، جنتامایسین، اگزاسیلین، سیپروفلوکسازین، افلوکسازین و ونکومایسین بر اساس روش دیسک دیفیوژن آگار انجام گرفت. تشکیل بیوفیلم و اسلایم توسط باکتری‌ها با روش کشت بافتی بر روی پلیت میکروتیتر پلی‌استرنی و کشت در محیط کنگو رد آگار انجام شد. حضور ژن‌های *icaA*، *icaD* و *mecA* با روش Multiplex PCR بررسی شد.

یافته‌ها: تعداد ۴۵ ایزوله از ۸۵ ایزولهٔ *استافیلوکوکوس اورئوس* (۵۲/۹۴ درصد)، به متی‌سیلین مقاوم بودند. ۱۰۰ درصد ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین توانایی تشکیل بیوفیلم و اسلایم را داشتند. ۵۵/۵۵ درصد ایزوله‌های تشکیل دهندهٔ بیوفیلم قوی و همهٔ ایزوله‌های تولید کنندهٔ اسلایم، خاصیت هیدروفوبیسیتی قوی داشتند. حضور هر سه ژن *icaA*، *icaD* و *mecA* نیز در همهٔ ایزوله‌های تولید کنندهٔ بیوفیلم و اسلایم دیده شد.

نتیجه‌گیری: نتایج مطالعهٔ نشان داد که همهٔ ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین با توانایی چسبندگی پلی‌ساکاریدی بین‌سلولی، اتصال محکم و قابلیت تشکیل بیوفیلم و اسلایم قوی، حاوی ژن‌های *icaA* و *icaD* بودند.

واژه های کلیدی: استافیلوکوکوس اورئوس، بیوفیلم، اسلایم، icaA، icaD.

مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین (Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*) از مهم‌ترین عوامل عفونت‌های بیمارستانی در سراسر دنیا است. این ارگانیسم با کلونیزاسیون در بیماران بستری در بیمارستان و در مواردی همچون دیالیز، جراحی، استفاده از کاتتر، سوند، و اعضای مصنوعی عامل تهدیدکنندهٔ حیات است. امروزه با ظهور سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به چندین آنتی‌بیوتیک، درمان عفونت‌های ناشی از آن به چالشی بزرگ تبدیل شده است (۱). همهٔ سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین حامل کاست کروموزومی بزرگ SCCmec کد کنندهٔ ژن mecA هستند. سایز تقریبی ژن *mecA*، ۲ Kb است. این ژن در یک ناحیه ۶۰-۲۵ Kb کروموزومی بنام ناحیه *mec* واقع است که آلل مشابه این ناحیه در سویه‌های حساس به متی‌سیلین وجود ندارد. ناحیه *mec* حامل بخش‌های متصل شونده به ترانسپوزون‌ها و حداقل یکی از توالی‌های IS*257* است که برای کسب پلاسمیدهای مقاوم به آنتی‌بیوتیک مورد نیاز است. ساختار و عملکرد ناحیه *mec* نشان می‌دهد که یک ترانسپوزون غیرعادی با لوکوس مخصوص به خود است. توالی ژن *mecA* در سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین و سویه‌های کواگولاز منفی مقاوم به متی‌سیلین به خوبی حفظ شده است (۲و۱). متی‌سیلین اولین پنی‌سیلین نیمه صناعی است که در سال ۱۹۶۰ معرفی شد. یک سال بعد از آن گونه‌های مقاوم به متی‌سیلین به سرعت ظاهر شدند. مکانیسم مقاومت به دلیل افزایش رونویسی از روی ژن *mecA* و جهش نقطه‌ای در پروموتور ژن است. سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین،

▣ این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی به شماره ۹۴۱۱۲۰۲۵۴۵ دانشگاه علوم پزشکی گلستان می‌باشد.
* مسئول مقاله: دکتر سجاد یزدان ستاد
آدرس: گرگان، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، دانشکده پزشکی، گروه میکروب‌شناسی. تلفن: ۰۱۷-۳۲۴۵۲۶۵۱
E-mail: sajjad.yazdansetad@gmail.com

پروتئین جدید متصل شونده به پنی‌سیلین بنام PBP2a را تولید می‌کنند. PBP2a تمایل کمی برای اتصال به متی‌سیلین و سایر آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام دارد. با این حال سنتز پپتیدوگلیگان دیوارهٔ سلولی باکتری با وجود این آنتی‌بیوتیک‌ها متوقف نشده و ادامه پیدا می‌کند (۲). در سال ۱۹۹۳ Boudewijn ثابت کرد که افزودن متی‌سیلین حتی با غلظت پائین به محیط کشت *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین سبب سنتز پپتیدوگلیکان غیرطبیعی موروپپتید می‌گردد که محصول PBP2a می‌باشد (۳). از مهمترین عوامل بیماری‌زایی و مقاومت چند دارویی باکتری، تشکیل بیوفیلم است. باکتری با تولید ادهسین‌های پلی ساکاریدی (Polysaccharide/adhesin) کپسولی به سطوح متصل و با ادهسین پلی‌ساکارید درون سلولی (Polysaccharide intercellular adhesin) و نیز سنتز پلی‌سوکسینیل گلوکز آمین باعث ضخیم‌تر شدن لایه‌های بیوفیلم می‌گردد. این مراحل تحت کنترل اپرون *icaADBC* و بویژه ژن‌های *icaA* و *icaD* است. ژن *icaA* کد کنندهٔ آنزیم N–استیل گلوکز آمینیل ترانسفراز است که در سنتز الیگومرهای N–استیل گلوکز آمین از N–UDP–استیل گلوکز آمین نقش دارد. ژن *icaD* نقش مهمی در افزایش بیان آنزیم N–استیل گلوکز آمینیل ترانسفراز دارد که منجر به افزایش بیان پلی‌ساکارید کپسول می‌گردد (۵و۴).

آب‌گریزی (Hydrophobicity) سطح باکتری در تسهیل تشکیل بیوفیلم به عنوان یک فاکتور بیماری‌زای دیگر مطرح است (۶). ماهیت آب‌گریزی سطح خارجی باکتری در اتصال غیر اختصاصی آن به سطوح پلاستیکی، اتصال به فاگوسیت‌ها و دیگر سلول‌های پستانداران و نیز در رشد سلول‌ها بر روی لایه‌های نامحلول آبگریز مثل هیدروکربن‌ها اهمیت دارد (۷). تشکیل اسلایم (Slime) توسط باکتری نیز از دیگر عوامل بیماریزا است. اسلایم متشکل از واحدهای گلوکز آمینیل گلیکان با پیوند گلیکوزیدی β [1-6] است. این پلی‌ساکارید خارج سلولی همچون ماتریکس سیمانی نقش مهمی را در اتصال باکتری به سطوح و تسهیل تشکیل بیوفیلم دارد. مطالعات نشان داده است که سنتز اسلایم نیز تحت کنترل اپرون *ica* است. بنابراین، لوکوس *ica* نقش مهمی را در پاتوژنز باکتری ایفا می‌کند (۸و۲). سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* با توانایی تشکیل بیوفیلم و اسلایم، قابلیت کلونیزاسیون، شیوع و انتقال بیشتری را دارند (۹).

استراتژی‌های جدید در کنترل عفونت نیازمند مطالعهٔ مکانیسم‌های مولکولی و همبستگی ژن‌های دخیل در بیماریزایی ارگانیسم است. مطالعهٔ حاضر با هدف بررسی حضور ژن‌های *icaA* و *icaD* مرتبط با تشکیل بیوفیلم و اسلایم در ایزوله‌های بالینی *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین حامل ژن *mecA* انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه: این مطالعه مقطعی پس از تصویب در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی گلستان با کد Ir.GOUMS.Rec.1394.172 بر روی تعداد ۸۵ باکتری مشکوک به *استافیلوکوکوس اورئوس* که از نمونه‌های بالینی: خون، خلط، آبسه، زخم بستر، زخم‌های پوستی و زخم‌های جراحی بیماران بستری در بیمارستان‌های ۵ آذر، شهید صیاد شیرازی و طالقانی گرگان از بهمن ماه ۱۳۹۴ تا اردیبهشت ماه ۱۳۹۵ جداسازی گردید، انجام شد.

کشت و خالص‌سازی باکتری: ایزوله‌های بالینی *استافیلوکوکوس اورئوس* ابتدا روی محیط کشت مولر هینتون آگار و سپس روی محیط انتخابی بلاد آگار کشت داده شدند. کلنی‌های باکتری از نظر ماکروسکوپی، میکروسکوپی و واکنش گرم بررسی شد. هویت ایزوله‌ها با استفاده از آزمون‌های متداول بیوشیمیایی از قبیل کاتالاز، کوآگولاز، تخمیر قند مانیتول و آزمون DNase تایید گردید.

آزمون حساسیت آنتی‌بیوتیکی: تعیین حساسیت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک با استفاده از روش دیسک دیفیوژن آگار Kirby & Bauer اصلاح شده بر اساس رهنمودهای CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) انجام گرفت. از باکتری تازه کشت داده شده در محیط تریپتیک سوی براث (Biolife, Italy) سوسپانسیون معادل استاندارد نیم مک‌فارلند (کلرید باریم دو آبه ۱/۱۷۵٪ و اسید سولفوریک ۱٪) تهیه شد. سوسپانسیون باکتری روی محیط مولرهینتون آگار (Biolife, Italy) بصورت متراکم کشت داده شد. دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی (MAST, UK) شامل پنی‌سیلین (۱۰µg)، جنتامایسین (۱۰µg)، اگزاسیلین (۱Mg)، سیپروفلوکسازین (۵ µg)، افلوکسازین (۵ µg) و ونکومایسین (۳۰ µg) در محیط کشت باکتری‌ها و با رعایت اصول استاندارد قرار داده شد.

استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 25923 به عنوان نمونهٔ کنترل استفاده گردید. پلیت‌ها در ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری شد. پس از ۲۴ ساعت، قطر هالهٔ عدم رشد باکتری‌ها با خط‌کش مخصوص اندازه‌گیری و با جدول استاندارد تدوین شده توسط شرکت سازندهٔ دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی و مطابق با استانداردهای CLSI بررسی گردید. جهت تعیین حداقل غلظت مهاری (Minimum Inhibitory Concentration) از استریپ‌های E-test اگزاسیلین (Liofilchem, Italy) بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. پس از ۲۴ ساعت گرماگذاری در ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد، سویه‌هایی را که حداقل غلظت مهاری آنها برابر و یا کمتر از ۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود به عنوان سویه‌های حساس به متی‌سیلین و سویه‌ها با حداقل غلظت مهاری برابر و یا بیشتر از ۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر به عنوان سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین در نظر گرفته شد (۱۰).

بررسی تشکیل بیوفیلم: توانایی تشکیل بیوفیلم توسط باکتری‌ها با روش پلیت کشت بافتی (Tissue Culture Plate) بر روی پلیت میکروتیتر پلی‌استرنی ۹۶ خانه‌ای بررسی شد. برای این منظور، باکتری‌ها به محیط کشت تریپتیک سوی براث به همراه ۱ درصد گلوکز تلقیح و در ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری گردید. از سوسپانسیون باکتری‌ها رقت ۱:۱۰۰ تهیه و مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از آن در چاهک‌های پلیت میکروتیتر بارگذاری گردید. یکی از چاهک‌ها به عنوان کنترل در نظر گرفته شد و با ۲۰۰ میکرولیتر از محیط کشت استریل تریپتیک سوی براث بارگذاری گردید. پلیت میکروتیتر در ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری گردید. سپس، چاهک‌های پلیت خالی شد و ۳ مرتبه با سرم فیزیولوژی استریل شستشو داده شد. برای اطمینان از حذف کامل باکتری‌های ناخواسته و غیر متصل به چاهک‌ها، پلیت میکروتیتر چندین بار به شدت تکان داده شد. به منظور تثبیت اتصال باکتری‌ها، ۲۰۰ میکرولیتر اتانول ۹۶ درجه به چاهک‌ها اضافه گردید. بعد از ۱۵ دقیقه، چاهک‌های پلیت تخلیه و در دمای آزمایشگاه خشک گردید. چاهک‌ها با ۲۰۰ میکرولیتر کریستال‌ویوله ۲ درصد به مدت ۵ دقیقه رنگ‌آمیزی شد. چاهک‌ها با آب مقطر به آرامی شستشو

داده شد و با ۲۰۰ میکرولیتر از حلال اسید استیک ۳۳ درصد بارگذاری و در ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه گرماگذاری گردید. جذب نوری چاهک‌های رنگ شده با کریستال‌ویوله در ۴۹۲ نانومتر توسط دستگاه الایزا (HumaReader HS, Germany) قرائت شد (۴). بررسی کمی تولید بیوفیلم توسط باکتری‌ها با استفاده از فرمول قراردادی و مطابق با جدول ۱ انجام گرفت (۱۱).

جدول ۱. محاسبه تولید بیوفیلم توسط باکتری‌ها بر اساس جذب نوری گرفته شده در ۴۹۲ نانومتر

Formula	Strong	Moderate	Weak	Negative
BF*=AB**-CW***	≥۰/۳۰۰	۰/۲۰۰–۰/۲۹۹	۰/۱۰۰–۰/۱۹۹	<۰/۱۰۰

*** Biofilm Formation; ** Stained attached Bacteria; *** Stained Control Wells**

بررسی تولید اسلایم و هیدروفوبیسیتی باکتری‌ها : به منظور بررسی توانایی اتصال ایزوله‌های باکتری به سطح، آزمون تولید اسلایم مطابق با روش استاندارد صورت گرفت. برای این منظور، از ایزوله‌های باکتری و سویهٔ استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC 25923) کشت تازه تهیه شد. کلنی‌های باکتری در محیط برین هارت اینفیوژن آگار (BHI) به همراه رنگ کنگو رد (Congo Red) و ۱۰ درصد ساکارز کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد گرماگذاری گردید. سپس، جهت تکمیل تولید اسلایم پلیت‌ها به مدت ۷۲ ساعت در دمای آزمایشگاه قرار داده شد (۵و۴).

برای تعیین هیدروفوبیسیتی سطح سلول باکتری‌ها از روش اتصال باکتری‌ها به هیدروکربن اکتان (Microbial Adhesion to Hydrocarbon) به عنوان یک سطح قابل اتصال استفاده شد. رسوب سلول‌های باکتری‌ها در بافر فسفات (PBS 0.01 M) با pH 7.2 حل و از آن سوسپانسیون با کدورت استاندارد نیم مک فارلند تهیه شد. جذب نوری سوسپانسیون در طول موج ۶۴۰ نانومتر مورد سنجش قرار گرفت و به عنوان جذب نوری اولیه (A) ثبت گردید. در مرحلهٔ بعد، هیدروکربن اکتان به سوسپانسیون اضافه و بخوبی مخلوط گردید. جهت تفکیک فاز آبی–آلی، نمونه به مدت ۱۰ دقیقه ساکن‌سازی و جذب نوری طول موج فاز آبی در طول موج ۶۴۰ نانومتر قرائت و به عنوان جذب نوری ثانویه (B) ثبت گردید. نهایتاً، درصد هیدروفوبیسیتی و میزان اتصال سلول‌های باکتری به هیدروکربن اکتان با فرمول زیر محاسبه گردید (۱۲و۷).

$$\text{هیدروفوبیسیتی} = \left(\frac{A-B}{B}\right)\times 100$$

A: جذب نوری اولیه در طول موج 640 nm، B: جذب نوری ثانویه در طول موج 640 nm

استخراج DNA باکتری‌ها: DNA باکتری‌ها بر اساس روش کادو (Kado) و لیو (Liu) با اندکی تغییرات و با استفاده از محلول فنل–کلروفرم استخراج شد. به رسوب سلولی باکتری‌ها مقدار ۱۵۰ میکرولیتر بافر تریس–استات و سدیم–EDTA (Tris-Acetate 40mM , Sodium EDTA 2mM , pH 7.9) و ۳ میکرولیتر لیزوزیم ۲۰ mg/ml و ۲۰۰ میکرولیتر بافر لیزکننده(pH 12.6، SDS 3%، Tris 50mM) اضافه گردید. سپس باکتری‌های لیز شده با ۹۰۰ میکرولیتر محلول فنل–کلروفرم عصاره‌گیری شدند. با افزودن ایزوپروپانل، DNA از فاز آبی رسوب داده شد و پس از شستشو با اتانل، DNA ژنومی در ۵۰ میکرولیتر آب مقطر حل گردید(۱۳).

شناسایی مولکولی ژن‌های *icaD*، *icaA*، *mecA*: پرایمرهای اختصاصی برای قطعات ژنی *icaA*، *icaD* و *mecA* طراحی شد (جدول ۲). واکنش PCR چندگانه ژن‌های *mecA*، *icaA*، *icaD* با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل: ۱۰ نانوگرم بر میکرولیتر DNA الگو، ۰/۴ میکرومولار از هر پرایمر فوروارد (F) و ریورس (R)، ۰/۲ میکرومولار dNTP، ۲ میکرومولار $MgCl_2$، ۲/۵ میکرولیتر بافر 10X و ۱ واحد آنزیم *Taq* DNA Polymerase (GENET BIO, Korea) انجام گردید. واکنش PCR در دستگاه ترمال‌سایکلر (Thermal Cycler PeQLab Primus 25-United Kingdom) با شرایط دمایی ۴ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در ۹۴ درجه سانتی‌گراد و در ادامه ۳۵ چرخه شامل واسرشت شدن در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال در ۴۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، طویل شدن در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه و در نهایت طویل شدن نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه انجام گرفت. محصولات واکنش روی ژل آگارز ۱ درصد و بمدت ۴۰ دقیقه در ۸۰ ولت الکتروفورز شد (۱۴).

تحلیل آماری: آزمایش با سه بار تکرار انجام پذیرفته و داده‌های به‌دست آمده از نتایج با نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۲۲ و با استفاده از آزمون کای اسکوئر تجزیه و تحلیل شدند و $p<۰/۰۵$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

جدول ۲. مشخصات پرایمرهای اختصاصی قطعات ژنی

قطعه ژنی	توالی الیگونوکلئوتید	سایز محصول (bp)	منبع
icaA	F: 5’-CCTAACTAACGAAAGGTAG-3’ R: 5’-AAGATATAGCGATAA GTGC-3’	۱۳۱۵	۱۵
icaD	F: 5’-AAACGTAAGAGAGGTGG-3’ R: 5’-GGCAATATGATCAAG ATAC-3’	۳۸۱	۱۵
mecA	F: 5’-TGGCTATCGTGTCACAATCG-3’ R: 5’-CTGGAACTTGTTGAGCAGAG-3’	۵۳۳	۱۶

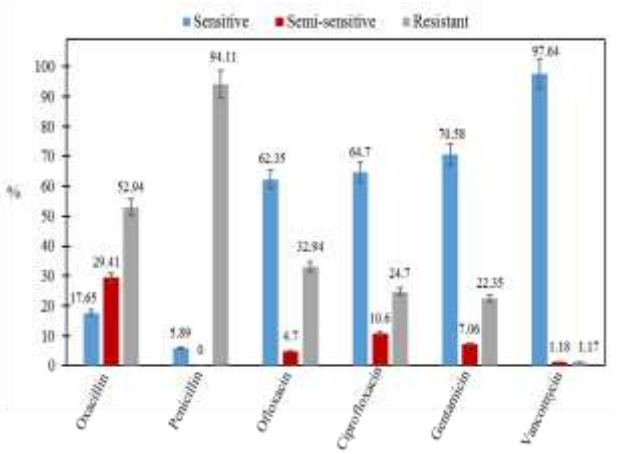
یافته‌ها

مشاهده میکروسکوپی و آزمون‌های بیوشیمیایی: مطالعهٔ میکروسکوپی ایزوله‌های باکتری با روش رنگ آمیزی گرم وجود کوکسی‌های گرم مثبت با آرایش خوشه‌های نامنظم را تایید کرد. آزمون‌های کلیدی کاتالاز، کواگولاز و DNase برای ایزوله‌ها مثبت گردید. مصرف مانیتول نیز توسط ایزوله‌ها با تغییر رنگ محیط از قرمز به زرد تایید شد.

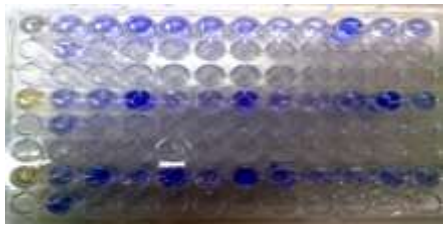
آزمون حساسیت آنتی‌بیوتیکی: تعداد ۴۵ ایزوله مقاوم به اگزاسیلین از ۸۵ (۵۲/۹۴٪)، ۲۵ از ۸۵ ایزوله (۲۹/۴۱٪) نیمه حساس به اگزاسیلین و ۱۵ از ۸۵ ایزوله (۱۷/۶۵٪) حساس به اگزاسیلین؛ تعداد ۸۰ از ۸۵ ایزوله (۹۴/۱۱٪) مقاوم به پنی‌سیلین، ۰ از ۸۵ (۰٪) ایزوله نیمه حساس به پنی‌سیلین و ۵ از ۸۵ ایزوله

(۵/۸۹٪) حساس به پنی‌سیلین؛ تعداد ۲۸ از ۸۵ ایزوله (۳۲/۹۴٪) مقاوم به افلوکسازین، ۴ از ۸۵ ایزوله (۴/۷۰٪) نیمه حساس به افلوکسازین و ۵۳ از ۸۵ (۶۲/۳۵٪) ایزوله حساس به افلوکسازین؛ تعداد ۲۱ از ۸۵ ایزوله (۲۴/۷۰٪) مقاوم به سیپروفلوکسازین، ۹ از ۸۵ ایزوله (۱۰/۶٪) نیمه حساس به سیپروفلوکسازین و ۵۵ از ۸۵ ایزوله (۶۴/۷۰٪) حساس به سیپروفلوکسازین؛ تعداد ۱۹ از ۸۵ ایزوله (۲۲/۳۵٪) مقاوم به جنتامایسین، ۶ از ۸۵ ایزوله (۷/۰۶٪) نیمه حساس به جنتامایسین و ۶۰ از ۸۵ ایزوله (۷۰/۵۸٪) حساس به جنتامایسین؛ تعداد ۱ از ۸۵ ایزوله (۱/۱۷٪) مقاوم به ونکومایسین، ۱ از ۸۵ ایزوله (۱/۱۸٪) نیمه حساس به ونکومایسین و ۸۳ از ۸۵ ایزوله (۹۷/۶۴٪) حساس به ونکومایسین گزارش شد (نمودار ۱). در بررسی حداقل غلظت مهاری برای آنتی‌بیوتیک اگزاسیلین نیز تعداد ۴۵ از ۸۵ ایزوله (۵۲/۹۴٪) مقاومت نشان دادند.

بررسی تشکیل بیوفیلم با روش میکروتیتر پلیت: توانایی اتصال ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین به سطح پلی‌استیرن و تشکیل بیوفیلم با روش میکروتیتر پلیت بررسی گردید (شکل ۱). جذب نوری (OD) در طول موج ۴۹۲ نانومتر نشان داد که ۶۶/۶٪ باکتری‌ها اتصال قوی و ۳۳/۳٪ باکتری‌ها اتصال نسبتاً قوی (متوسط) به سطح پلی‌استیرن برقرار کردند و در واقع همهٔ ایزوله‌ها توانایی تشکیل بیوفیلم را داشتند. نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که به لحاظ آماری تفاوت معنی داری در اتصال باکتری‌ها به سطح پلی‌استیرن و تشکیل بیوفیلم وجود نداشت ($p<۰/۰۵$).



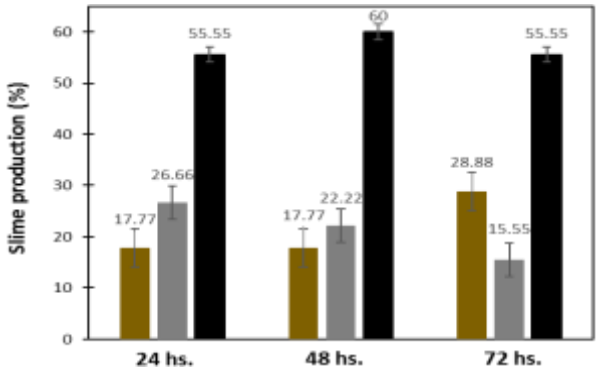
نمودار ۱. درصد توزیع حساسیت–مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*. (آزمایش با سه بار تکرار انجام پذیرفته و نوارهای خطا بر اساس خطای نسبی در نظر گرفته شده است.)



شکل ۱. بیوفیلم تشکیل شده توسط باکتری‌ها در سطح پلی‌استیرن در پلیت میکروتیتر (چاهک با رنگ آبی پررنگ: بیوفیلم قوی، چاهک با رنگ آبی معمولی: بیوفیلم متوسط و چاهک با رنگ سفید متمایل به آبی: بیوفیلم ضعیف)

تولید اسلایم در محیط کنگو رد آگار: همهٔ ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین که در محیط کنگو رد آگار کشت داده شده بودند، با ایجاد کلنی‌های خشن، خشک و با رنگ سیاه، خاکستری و قهوه‌ای و تغییر رنگ محیط از صورتی به قهوه‌ای متمایل به سیاه قادر به تولید اسلایم بودند (شکل ۲). تولید اسلایم در ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت از کشت ایزوله‌های باکتری بررسی شد. باکتری-هایی که کلنی‌های سیاه در محیط ایجاد کرده بودند اسلایم قوی، باکتری‌ها با کلنی‌های خاکستری اسلایم متوسط و باکتری‌ها با کلنی‌های قهوه‌ای اسلایم ضعیف داشتند (نمودار ۲).

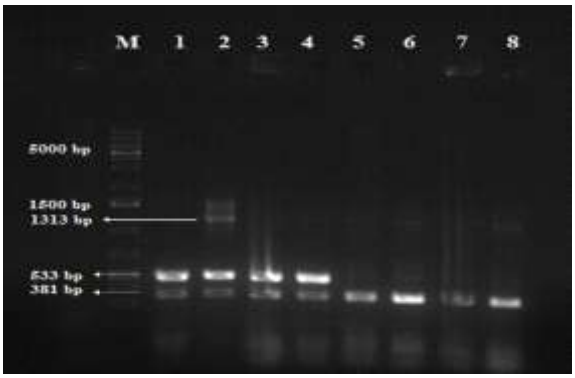
شکل ۲. عدم تولید اسلایم توسط ایزوله‌ها در محیط کنگو رد آگار (سمت راست)، تولید اسلایم توسط ایزوله‌ها در محیط کنگو رد آگار (سمت چپ)



نمودار ۲. درصد تولید اسلایم توسط ایزوله‌ها با ایجاد کلنی‌های سیاه، خاکستری، قهوه‌ای در محیط کنگورد آگار بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت. (آزمایش با سه بار تکرار انجام پذیرفته و نوارهای خطا بر اساس خطای نسبی در نظر گرفته شده است.)

بررسی هیدروفوبیسیتی و ارتباط آن با بیوفیلم و اسلایم: با بررسی هیدروفوبیسیتی و اتصال سلول‌های باکتری به هیدروکربن اکتان مشخص شد که ۶۰ درصد ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین خاصیت هیدروفوبیسیتی قوی، ۱۷/۷۷ درصد خاصیت هیدروفوبیسیتی متوسط و ۲۲/۲۲ درصد خاصیت هیدروفوبیسیتی ضعیف داشتند. بررسی ارتباط هیدروفوبیسیتی و بیوفیلم نشان داد که ۵۵/۵۵ درصد باکتری‌هایی که بیوفیلم قوی تشکیل داده بودند، دارای خاصیت هیدروفوبیسیتی قوی نیز بودند. بررسی ارتباط هیدروفوبیسیتی و اسلایم نشان داد که تمامی باکتری‌هایی را که توانایی بالایی در تولید اسلایم داشتند، خاصیت هیدروفوبیسیتی قوی نیز داشتند. بررسی ارتباط بیوفیلم و اسلایم نیز نشان داد که تشکیل بیوفیلم با اسلایم رابطهٔ مستقیم دارد.

شناسایی ژن‌های *mecA*، *icaA*، *icaD* با روش Multiplex PCR: تکثیر چندگانهٔ ژن‌های *icaA*، *mecA* و *icaD* نشان دهندهٔ وجود این سه ژن در ایزوله‌های بالینی *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین با توانایی تشکیل بیوفیلم و اسلایم بود (شکل ۳).



شکل ۳: ستون M: سایز مارکر (O, Gene Ruller 1kb plus-Fermentas)، ستون‌های ۸-۱: تکثیر چندگانهٔ ژن‌های *icaA* (1313 bp)، *mecA* (533 bp) و *icaD* (381 bp) ایزوله‌های منتخب *استافیلوکوکوس اورئوس*

بحث و نتیجه‌گیری

در مطالعهٔ حاضر فراوانی *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین ۵۲/۹۴ درصد گزارش شد. بر اساس مطالعات انجام گرفته در مناطق متعدد دنیا و جوامع مورد مطالعه، بیشترین فراوانی *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین در آمریکا، آسیا و جزیرهٔ مالت با نرخ ۵۰ درصد و فراوانی متوسط آن با نرخ ۵۰-۲۵ درصد در آفریقا، چین و اروپا گزارش شده است.

این در حالی است که در برخی از نواحی اروپا فراوانی *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین کمتر از ۵۰ درصد است (۱۷). در بررسی اپیدمیولوژیکی که Askari و همکاران در مورد فراوانی ژن *mecA* در سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین در شهرهای اهواز، فلاورجان، فسا، گرگان، همدان، اصفهان، کاشان، مشهد، سنندج، شهرکرد، شیراز، تبریز، تهران و تنکابن انجام دادند، بطور متوسط ۵۲/۷ درصد سویه‌ها حاوی ژن *mecA* بودند. بطوریکه بیشترین فراوانی *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین از تهران با ۹۰ درصد و کمترین فراوانی آن از اصفهان با ۲۰/۴۸ درصد گزارش گردید (۱۸).

یکی از علل مقاومت آنتی‌بیوتیکی *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین و عدم پاسخ ارگانیسم به درمان، تشکیل بیوفیلم است. تشکیل بیوفیلم توسط باکتری سبب پایداری و مزمن شدن عفونت می‌گردد (۴). گزارش‌های متعددی مبنی بر شیوع ژن‌های *ica* در سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین در کشورهای مختلف وجود دارد (۱۹). ژن‌های *icaA* و *icaD* از مهمترین ژن‌های درگیر در تشکیل بیوفیلم و تشدید عفونت توسط باکتری است (۴و۶). در مطالعهٔ حاضر تعداد ۴۵ ایزولهٔ مقاوم به متی‌سیلین حاوی ژن *mecA* انتخاب گردید و توانایی تشکیل بیوفیلم توسط ۱۰۰ درصد ایزوله‌ها تایید شد که اغلب ایزوله‌ها (۶۶/۶٪) بطور قوی توانایی تشکیل بیوفیلم را داشتند. ژن‌های *icaA* و *icaD* نیز در همهٔ ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین حضور داشتند. Ohadian Moghadam و همکاران فراوانی ژن *mecA* در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین را که از بیماران بستری در بخش سوختگی بیمارستان مطهری تهران جدا کرده بودند، ۶۱/۵۴ درصد گزارش کردند. ۹۷/۵ درصد ایزوله‌ها در مطالعهٔ آنها توانایی تولید اسلایم و بیوفیلم را داشتند و همهٔ ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین و نیز همهٔ ایزوله‌ها با توانایی تشکیل بیوفیلم، حاوی هر دو ژن *icaA* و *icaD* بودند (۲۰). مطالعهٔ ما با مطالعهٔ اخیر مطابقت داشت که ۱۰۰ درصد ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین در مطالعهٔ ما توانایی تولید اسلایم و بیوفیلم را داشتند. بنا به گزارش Ohadian Moghadam و همکاران، ژن‌های *icaA* و *icaD* برای چسبندگی پلی ساکاریدی بین سلولی و اتصال باکتری و تشکیل بیوفیلم لازم هستند (۲۰).

Sanchez و همکاران نیز گزارش کردند که سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین با مقاومت به چندین آنتی‌بیوتیک، معمولا بیوفیلم قوی‌تری را تشکیل می‌دهند (۱۲). بررسی ارتباط هیدروفوبیسیتی و بیوفیلم در مطالعهٔ ما نشان داد که ۵۵/۵۵ درصد سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* که بیوفیلم قوی برقرار کرده بودند، هیدروفوبیسیتی قوی نیز داشتند. Mafu و همکاران گزارش دادند که *استافیلوکوکوس اورئوس* خاصیت هیدروفوبیسیتی متوسط برای اتصال به پلی‌استیرن دارد (۲۱). Pagedar و همکاران نیز نشان دادند که چسبندگی باکتری به سطوح بطور مستقیم با آبگریزی سلول در ارتباط است و هر چه سلول آبگریزتر باشد چسبندگی به سطح نیز بیشتر خواهد بود (۲۲). تمام سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین در مطالعهٔ ما تولید کنندهٔ اسلایم بودند. بررسی ارتباط هیدروفوبیسیتی و اسلایم نیز در مطالعهٔ ما نشان داد که باکتری‌هایی که هیدروفوبیسیتی قوی داشتند، اسلایم بیشتری را تولید کرده بودند. Oliveria و همکاران نیز با استفاده از روش کنگو رد آگار، میزان تولید اسلایم در سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین را ۷۳ درصد گزارش کردند. همهٔ سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* تولید کنندهٔ اسلایم در مطالعهٔ آنها حامل هر دو ژن *icaA* و *icaD* بودند (۲۳). براساس یافته‌های Türkyilmaz و همکاران تولید اسلایم ممکن است باعث مقاومت سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* به آنتی‌بیوتیک شود (۲۴). Ciftci و همکاران نیز در مطالعه‌ای که بر روی ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین انجام دادند، به نتایج مشابهی دست یافتند و افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* را ناشی از تولید اسلایم دانستند (۲). Satorres و همکاران نیز تولید اسلایم و بیوفیلم در سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* را مورد بررسی قرار دادند و ۳۵/۲ درصد این سویه‌ها را از نظر وجود هر دو ژن *icaA* و *icaD* مثبت ارزیابی کردند (۲۵). در بررسی ارتباط تشکیل بیوفیلم و تولید اسلایم در مطالعهٔ ما مشخص شد که بین این دو مورد رابطهٔ مستقیمی وجود دارد و ژن‌های *icaA* و *icaD* در همه ایزوله‌ها با توانایی تشکیل توام بیوفیلم و اسلایم وجود داشت. این مسئله نیازمند تحقیقات بیشتر و بررسی جامعهٔ مورد مطالعهٔ گسترده‌تری است. در تحقیق حاضر به دلیل محدودیت‌های زمانی امکان مطالعه بر روی ایزوله‌ها با تعداد بالا نبود. ضمن اینکه دو ژن دیگر اپرون *ica* (*icaB* و *icaC*) نیز در بررسی ما، لحاظ نگردید.

سنتز اسلایم نیز همانند بیوفیلم تحت کنترل اپرون *ica* است (۲۶). مطالعه Kara Terki و همکاران نیز حاکی از نقش مهم ژن‌های *ica* به عنوان مارکر بیماریزایی در گونه‌های *استافیلوکوکوس* بود. این ارتباط با سویه‌های تشکیل

دهندهٔ بیوفیلم نشان می‌دهد که بیان ژن‌های *icaA* و *icaD* نقش مهمی را در مکانیسم‌های آسیب‌رسانی ارگانیسم ایفا می‌کند (۲۷). El-Mahallawy و همکاران نشان دادند که ارتباط قوی و معنی‌داری بین وجود ژن‌های *ica* و تولید اسلایم و بیوفیلم وجود دارد (۲۸).

Yazdani و همکاران نیز نشان دادند که تولید اسلایم و بیوفیلم در حضور ژن‌های *icaA* و *icaD* صورت می‌گیرد (۵). Nuryastuti و همکاران نیز اظهار داشتند که تولید اسلایم در بین سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* ارتباط معنی‌داری با تشکیل بیوفیلم قوی در این سویه‌ها دارد (۲۹). Fowler و همکاران نیز نشان دادند که ژن‌های *icaA* و *icaD* در تمام سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* با توانایی تشکیل بیوفیلم وجود دارند (۳۰). Nasra و همکاران ضمن استفاده از دو روش فنوتیپی کنگو رد آگار و پلیت میکروتیتر در سویه‌های *استافیلوکوکوس*، میزان تولید بیوفیلم را ۴۶ درصد و حضور ژن‌های *icaA* و *icaD* را ۳۲ درصد گزارش کردند. بنا بر اظهار Nasra و همکاران علیرغم وجود ژن‌های *icaA* و *icaD* در سویه‌های *استافیلوکوکوس*، ارتباط معنی‌داری مبنی بر تشکیل بیوفیلم در شرایط in vitro وجود نداشت و تعدادی از سویه‌های *استافیلوکوکوس* با توانایی تشکیل بیوفیلم، فاقد ژن‌های *icaA* و *icaD* بودند (۳۱). همچنین Fitzpatrick و همکاران نیز بر این مورد اذعان داشتند که تشکیل بیوفیلم در ایزوله‌های کلینیکی *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد مطالعه آنها در شرایط in vitro مستقل از وجود ژن‌های *icaADBC* بود (۳۲). Eftekhar و همکاران نیز در این مورد به نتایج مشابه رسیدند و تولید بیوفیلم در *استافیلوکوکوس اورئوس* را مستقل از ژن‌های *ica* دانستند (۳۳). تشکیل بیوفیلم در سویه‌های *استافیلوکوکوس* وابسته به شرایط محیطی و متاثر از سیگنال‌های محیطی است که می‌تواند در پاسخ به استرس‌های خارجی و غلظت-های مهاری آنتی‌بیوتیک‌ها باشد (۳۴). شرایط بی‌هوازی و غلظت‌های کم آهن نیز به تشکیل بیوفیلم کمک می‌کند (۲۷). عدم تشکیل بیوفیلم علیرغم حضور ژن-های *ica* می‌تواند به علت غیر فعال شدن اپرون *ica* با فعال شدن رپرسور *icaR* و یا تحت تاثیر فرآیندهای پسا رونویسی باشد (۳۵). این مسئله نیازمند مطالعات ژنتیکی بیشتر و بررسی‌های مکانسیم‌های مولکولی غیر وابسته به اپرون *ica* است.

براساس نتایج این مطالعه ژن‌های *icaA* و *icaD* برای چسبندگی پلی ساکاریدی بین سلولی، اتصال باکتری و تشکیل بیوفیلم و اسلایم در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* ضروری به نظر می‌رسند. درک درست این مسئله نیازمند مطالعات مولکولی بیشتر اپرون *ica* و مکانیسم‌های وابسته به آن است.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی گلستان تشکر و قدردانی می گردد.

Detection of Intercellular Adhesion (*ica*) Genes Involved in Biofilm and Slime Formation in Clinical Isolates of Staphylococcus Aureus Harboring *mecA* Gene

N. Yousefi Nojookambari (MSc)[1], S. Yazdansetad (PhD)[2,3*], A. Ardebili (PhD)[2,3], M. Saki (PhD)[4,5], E. Najjari (MSc)[2,3]

1.Infectious Diseases & Tropical Medicine Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, I.R.Iran.
2.Laboratory Science Research Center, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, I.R.Iran
3. Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, I.R.Iran
4.Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, I.R.Iran
5.Student Research Committee, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, I.R.Iran

J Babol Univ Med Sci; 20(6); June 2018; PP: 27-35
Received: Jun 26th 2017, Revised: Oct 17th 2017, Accepted: Apr 4th 2018.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains is one of the most important health care problems and life-threatening in worldwide. The methicillin resistant *S. aureus* strains producing biofilm and slime have potential to colonize and transmit. The present study was conducted to detect intercellular adhesion (*ica*) genes involved in biofilm and slime formation in clinical isolates of methicillin resistant *S. aureus* harboring *mecA* gene.

METHODS: In this cross-sectional study, a total of 85 bacterial isolates suspected to *S. aureus* were prepared from clinical samples. The antibiotic susceptibility testing of bacteria to the penicillin, gentamicin, oxacillin, ciprofloxacin, ofloxacin and vancomycin was carried out based on disk diffusion agar method. Biofilm and slime formation of bacteria were examined by tissue culture polystyrene plate (TCP) and Congo red agar (CRA). The presence and frequency of *icaA*, *icaD* and *mecA* genes were detected by multiplex PCR.

FINDINGS: 45 out of 85 (52.94%) *S. aureus* isolates were resistant to the methicillin. All of methicillin resistant *S. aureus* were able to produce biofilm and slime. Consumedly surface hydrophobicity was seen in 55.55% and 100% of strains producing strong biofilm and slime, respectively. The *icaA*, *icaD* and *mecA* genes were present in all biofilm and slime producing isolates.

CONCLUSION: Our results showed that the all methicillin resistant *S. aureus* isolates with some abilities, including polysaccharide intercellular adhesion, bacterial attachment, biofilm and slime production were positive for *icaA* and *icaD* genes.

KEY WORDS: *Staphylococcus aureus*, Biofilm, Slime, *icaA*, *icaD*.

Please cite this article as follows:

Yousefi Nojookambari N, Yazdansetad S, Ardebili A, Saki M, Najjari E. Detection of Intercellular Adhesion (*ica*) Genes Involved in Biofilm and Slime Formation in Clinical Isolates of Staphylococcus Aureus Harboring *mecA* Gene. J Babol Univ Med Sci. 2018;20(6):27-35.

•Corresponding Author: S. Yazdansetad (PhD)
Address: Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran
Tel: +98 17 32452651
E-mail: sajjad.yazdansetad@gmail.com

References

1.Konrad P, Adriana ER, and Węgrzyn G. Staphylococcus aureus as an infectious agent: overview of biochemistry and molecular genetics of its pathogenicity. Acta Biochimica Polonica. 2009;56(4):597-612.

2.Ciftci A, Findik A, Onuk EE, Savasan S. Detection of methicillin resistance and slime factor production of Staphylococcus aureus in bovine mastitis. Braz J Microbiol. 2009;40(2):254-61.

3.Pai V, Rao VI, Rao SP. Prevalence and antimicrobial susceptibility pattern of methicillin-resistant Staphylococcus aureus [MRSA] isolates at a tertiary care hospital in Mangalore, South India. J Lab Physicians. 2010;2(2):82-4.

4.Murugan K, Usha M, Malathi P, Saleh al-Sohaibani A, Chandrasekaran M. Biofilm forming multi drug resistant Staphylococcus spp. among patients with conjunctivitis. Pol J Microbiol. 2010;59(4):233-9.

5.Yazdani R, Oshaghi M, Havayi A, Pishva E, Salehi R, Sadeghizadeh M. Detection of icaAD gene and biofilm formation in Staphylococcus aureus isolates from wound infections. Iran J Publ Health. 2006;35:25-8.

6.Cerca N, Pier GB, Vilanova M, Oliveira R, Azeredo J. Quantitative analysis of adhesion and biofilm formation on hydrophilic and hydrophobic surfaces of clinical isolates of Staphylococcus epidermidis. Res Microbiol. 2005;156(4):506-14.

7.Rosenberg M. Bacterial adherence to polystyrene: a replica method of screening for bacterial hydrophobicity. Appl Environ Microbiol. 1981;42(2):375-7.

8.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.

9.Arslan S, Özkarde F. Slime production and antibiotic susceptibility in staphylococci isolated from clinical samples. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 2007;102(1):29-33.

10.CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Twenty-Fifth Informational Supplement. CLSI document M100-S25. Wayne, PA. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015.

11.Stepanovic S, Vukovic D, Hola V, Bonaventura G, Djukic S, Cirkovic I, et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. APMIS. 2007;115(8):891-9.

12.Sanchez CJ, Mende K, Beckius ML, Akers KS, Romano DR, Wenke JC, Murray CK. Biofilm formation by clinical isolates and the implications in chronic infections. BMC Infect Dis. 2013;13:47-53.

13.Kado CI, Liu ST. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. J Bacteriol. 1981;145(3):1365-73.

14.Green MR, Sambrook J. Molecular cloning: a laboratory manual. 4rd ed. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory; 2012.

15.Diemond-Hernández B, Solórzano-Santos F, Leaños-Miranda B, Peregrino-Bejarano L, Miranda-Novales G. Production of icaADBC-encoded polysaccharide intercellular adhesin and therapeutic failure in pediatric patients with staphylococcal device-related infections. BMC Infect Dis. 2010;10:68-74.

16.Vannuffel P, Gigi J, Ezzedine H, Vandercam B, Delmee M, Wauters G, Gala JL. Specific detection of methicillin-resistant Staphylococcus species by multiplex PCR. J Clin Microbiol. 1995;33:2864-7.

17.Mejía C, Zurita J, Guzmán-Blanco M. Epidemiology and surveillance of methicillin resistant Staphylococcus aureus in Latin America. Braz. J Infect Dis. 2010;14(2):79-86.

18.Askari E, Soleymani E, Arianpoor A, Tabatabai SM, Amini A, Naderi Nasab M. Epidemiology of mecA-methicillin resistant Staphylococcus aureus in Iran: A Systematic Review and Meta-analysis. Iran J Basic Med Sci. 2012;15(5):1010-9.

19.Mirzaee M, Najar Peerayeh SH, 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.

20.Ohadian Moghadam S, Pourmand MR, Aminharati F. Biofilm formation and antimicrobial resistance in methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolated from burn patients, Iran. J Infect Dev Ctries. 2014;8(12):1511-7.

21.Mafu AA, Plumety C, Deschênes L, Goulet J. Adhesion of pathogenic bacteria to food contact surfaces: Influence of pH of culture. Int J Microbiol. 2011; 2011:972494.
22.Pagedar A, Singh J, Batish VK. Surface hydrophobicity, nutritional contents affect Staphylococcus aureus biofilms and temperature influences its survival in preformed biofilms. J Basic Microbiol. 2010;50: S98-S106.
23.Oliveira A, de Lourdes RS, Cunha M. Comparison of methods for the detection of biofilm production in coagulase-negative staphylococci. BMC Res Notes. 2010;3(1):260.
24.Türkyilmaz, S, Eskiizmirliler S. Detection of slime factor production and antibiotic resistance in staphylococcus strains isolated from various animal clinical samples. Turk J Vet Anim Sci. 2006;30(1):201-6.
25.Satorres SE, Alcaraz LE. Prevalence of icaA and icaD genes in Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis strains isolated from patients and hospital staff. Cent Eur J Publ Health. 2007;15(2):87-90.
26.Martin-Lopez JV, Perez-Roth E, Claverie-Martin F, Diez-Gil O, Batista N, MoralesM, et al. Detection of Staphylococcus aureus clinical isolates harboring the ica gene cluster needed for biofilm establishment. J Clin Microbiol. 2002;40:1569-70.
27.Kara Terki I, Hassaine H, Oufrid S, Bellifa S, Mhamedi I, Lachachi M, et al. Detection of icaA and icaD genes and biofilm formation in Staphylococcus spp. isolated from urinary catheters at the University Hospital of Tlemcen (Algeria). Afr J Microbiol Res. 2013;7(47):5350-7.
28.El Mahallawy HA, Samah A. El-Wakil LM, Abeer K, Morcos H. Clinical implications of icaA and icaD genes in coagulase negative Staphylococci and S. aureus bacteremia in febrile neutropenic pediatric cancer patients. Pediatr Blood Cancer. 2009;52(7):824-8.
29.Nuryastuti T, van der Mei HC, Busscher HJ, Kuijer R, Aman AT, Krom BP. recA mediated spontaneous deletions of the icaADBC operon of clinical Staphylococcus epidermidis isolates: a new mechanism of phenotypic variations. Antonie Van Leeuwenhoek. 2008;94(2): 317-28.
30.Fowler Jr VG, Fey PD, Reller LB, Chamis AL, Corey GR, Rupp ME. The intercellular adhesin locus ica is present in clinical isolates of Staphylococcus aureus from bacteremic patients with infected and uninfected prosthetic joints. Medical Microbiol Immun. 2001;189(3):127-31.
31.Nasra RA, AbuShadyb HM, Hussein SH. Biofilm formation and presence of icaAD gene in clinical isolates of staphylococci. The Egypt J Med Hum Gen. 2012;13(3):269-74.
32.Fitzpatrick F, Humphreys H, O'Gara JP. Evidence for icaADBC independent biofilm development mechanism in methicillin-resistant Staphylococcus aureus clinical isolates. J Clin Microbiol. 2005;43(4):1973-6.
33.Eftekhar 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.
34.Mathur T, Singhal S, Khan S, Upadhyay DJ, Fatma T, Rattan A. Detection of biofilm formation among the clinical isolates of Staphylococci: An evaluation of three different screening methods. Indian J Med Microbiol. 2006;24(1):25-9.
35.Serray B, Oufrid S, Hannaoui I, Bourjilate F, Soraa N, Mliji M, Sobh M, Hammoumi A, Timinouni M, El Azhari M. Genes encoding adhesion factors and biofilm formation in methicillin-resistant Staphylococcus aureus in Morocco. J Infect Dev Ctries. 2016;10(8):863-9.