

Phenotypic Investigation of Biofilm Formation and the Prevalence of *icaA* and *icaD* Genes in *Staphylococcus epidermidis* Isolates

Teena Dadgar^{*1}, Zahra Vahedi¹, Sajjad Yazdansatad², Elahe Kiaei³, Hanieh Asaadi⁴

1. Department of Biology, Gorgan Branch, Islamic Azad University, Gorgan, Iran
2. Department of Microbiology, School of Medicine, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran
3. Young Researchers Club, Gorgan Branch, Islamic Azad University, Gorgan, Iran
4. Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Medicine, Bushehr University of Medical Sciences, Bushehr, Iran

Article Information

Article history:

Received: 2018/12/05
Accepted: 2019/01/03
Available online: 2019/03/06

Article Subject:

Medical Bacteriology

IJMM 2019; 12(6): 371-381

Corresponding author:

Teena Dadgar

Department of Biology,
Gorgan Branch, Islamic Azad
University, Gorgan, Iran

Email:

dadgar_teena@yahoo.com

Use your device to scan
and read the article online



Abstract

Background and Aims: The most important factor for pathogenicity of *Staphylococcus epidermidis* is the ability to produce biofilm. Identification of biofilm-forming strains using an appropriate method and recognizing the mechanisms of biofilm formation can help understand the proper use of artificial medical equipment and prevent increased drugs resistance. The aim of this study was to 1) evaluate the biofilm formation of *S. epidermidis* isolates using phenotypic methods such as Tube Method (TM), Congo Red Agar Method (CRA) and Microtiter Plates Method (MTP) as well as PCR of the genes *icaA* and *icaD* 2) determine the drug resistance pattern of *S. epidermidis* isolates and its association with biofilm formation among clinical specimens and samples of healthy carriers.

Materials and Methods: A total of 90 strains of *S. epidermidis* including 50 clinical isolates and 40 strains from healthy carriers were studied using the phenotypic methods TM, CRA and MTP, and the molecular PCR of the genes *icaA* and *icaD*. Antibiotic resistance profile of the strains was performed using disk diffusion method according to the CLSI standards.

Results: A total of 90 strains (63.34% by TM, 37.78% by CRA method and 67.79% of MTP method) were able to form biofilm. No significant differences were found between the healthy and carriers groups in terms of antibiotic resistance. The *icaA* and *icaD* genes were detected among 100% and 85.24% of the biofilm forming strains, respectively.

Conclusions: Comparing the phenotypic and molecular methods for the detection of biofilm formation among *S. epidermidis* isolates showed that MTP is the best method with the highest sensitivity and specificity and its simultaneous use with molecular methods is recommended.

Keywords: *Staphylococcus epidermidis*, Biofilm, Antibiotic resistance, PCR.

How to cite this:

Dadgar T, Vahedi Z, Yazdansetad S, Kiaei E, Asaadi H. Phenotypic Investigation of Biofilm Formation and the Prevalence of *icaA* and *icaD* Genes in *Staphylococcus epidermidis* Isolates. Iran J Med Microbiol. 2019; 12 (6) :371-381



ارزیابی فنوتیپی تشکیل بیوفیلم و تعیین حضور ژن های *icaA* و *icaD* در جدایه های بالینی *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*

تینا دادگر^{۱*}، زهرا واحدی^۱، سجاد یزدان ستاد^۲، الهه کیایی^۲، هانیه اسعدی^۴

۱. گروه زیست شناسی، واحد گرگان، دانشگاه آزاد اسلامی، گرگان، ایران
۲. گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران
۳. باشگاه پژوهشگران جوان، واحد گرگان، دانشگاه آزاد اسلامی، گرگان، ایران
۴. گروه میکروبیولوژی و انگل شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر، بوشهر، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

زمینه و هدف: مهم ترین فاکتور در بیماری زایی *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* توانایی تشکیل بیوفیلم است. شناسایی سویه های ایجادکننده بیوفیلم با استفاده از یک روش مناسب و شناخت مکانیسم های اتصالی آنها در تولید بیوفیلم می تواند به فهم درست استفاده از تجهیزات پزشکی مصنوعی و جلوگیری از افزایش مقاومت به داروها کمک کند. هدف از این مطالعه، ارزیابی روش های فنوتیپی (لوله ای، کنگورد آگار و میکروتیتر پلیت) و روش مولکولی PCR با ژن های *icaA* و *icaD* برای شناسایی بیوفیلم *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* و تعیین الگوی مقاومت دارویی و رابطه آن با تشکیل بیوفیلم در نمونه های بالینی و ناقلین سالم بود.

مواد و روش کار: عداد ۵۰ جدایه بالینی و ۴۰ جدایه از ناقلین *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* با استفاده از روش های فنوتیپی لوله ای، کنگورد آگار و میکروتیتر پلیت و روش مولکولی PCR با ژن های *icaA* و *icaD* بررسی شدند. مقاومت آنتی بیوتیکی سویه ها با استفاده از روش دیسک دیفیوژن براساس استانداردهای CLSI انجام شد.

یافته ها: با استفاده از روش لوله ای ۶۳/۳۴ درصد از جدایه ها و با استفاده از روش کنگورد آگار ۳۷/۷۸ درصد و با روش میکروتیتر پلیت ۶۷/۷۹ درصد جدایه ها، توانایی تشکیل بیوفیلم را داشتند. تفاوت معنی داری بین دو گروه بیمار و ناقل مشاهده نشد. *icaA* در ۱۰۰ درصد و *icaD* در ۸۵/۲۴ درصد سویه های تشکیل دهنده بیوفیلم شناسایی شد.

نتیجه گیری: مقایسه بین روش های فنوتیپی و روش های مولکولی با استفاده از ژن های *icaA* و *icaD* برای تشخیص بیوفیلم نشان داد که MTP بهترین روش برای تشخیص بیوفیلم با بیشترین حساسیت و اختصاصیت است و استفاده هم زمان آن با روش های مولکولی توصیه می شود.

کلمات کلیدی: *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*، بیوفیلم، مقاومت آنتی بیوتیکی، PCR

تاریخچه مقاله
دریافت: ۱۳۹۷/۰۹/۱۴
پذیرش: ۱۳۹۷/۱۱/۱۰
انتشار آنلاین: ۱۳۹۷/۱۲/۲۵
موضوع:
باکتری شناسی پزشکی
IJMM1397;12(6): 371-381

نویسنده مسئول:

تینا دادگر

گروه زیست شناسی، واحد گرگان،
دانشگاه آزاد اسلامی، گرگان، ایران

پست الکترونیک:

dadgar_teena@yahoo.com

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

مقدمه

عفونت های بیمارستانی است. عامل مهم و کلیدی در بیماری زایی این گونه، کلونیزه شدن و تشکیل بیوفیلم چندلایه است. بیوفیلم، ساختاری متشکل از جمعیت باکتریایی است که به وسیله ماتریکس پلی ساکاریدی باکتری ها محصور شده است و به علت داشتن ویژگی های خاص فیزیولوژی و ساختاری، باعث مقاومت به بسیاری از آنتی بیوتیک ها و مکانیسم های دفاعی میزبان می شود

استافیلوکوک های کواگولاز منفی (CoNS) فراوان ترین فلور میکروبی و غیربیماری زای ساکن پوست و غشاهای مخاطی هستند که تحت شرایط خاصی می توانند باعث ایجاد بیماری به ویژه در بیماران نقص ایمنی شوند. *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* غالب ترین گونه از *استافیلوکوک* های کواگولاز منفی در ارتباط با عفونت های حاصل از سوندگذاری، جراحی مفصل، پروتز و

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری و شناسایی سویه‌های باکتریایی

تعداد ۹۰ نمونه *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*، شامل ۴۰ نمونه سوپ بینی از افراد سالم و ۵۰ نمونه کلینیکی شامل عفونت‌های خون، چشم و ادرار از بیمارستان‌ها، مراکز آموزشی - درمانی و آزمایشگاه‌های تشخیص طبی شهرستان گرگان از اسفندماه ۱۳۹۴ تا خردادماه ۱۳۹۵ جمع‌آوری و در محیط مانیتول سالت آگار (شرکت مرک، آلمان) کشت داده و به مدت ۲۴ ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شدند. کلنی‌های سفیدرنگ و مانیتول منفی برای بررسی‌های بیشتر خالص‌سازی شدند. تمام نمونه‌ها از لحاظ موفولوژی در رنگ‌آمیزی گرم و آزمون‌های بیوشیمیایی افتراقی آزمایشگاهی از جمله کاتالاز، اکسیداز، کواگولاز، اوره و حساسیت به نوویوسین مورد بررسی قرار گرفتند. در تمام آزمایش‌ها سویه *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* ATCC 35984 به‌عنوان کنترل مثبت تشکیل‌دهنده بیوفیلیم و *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* ATCC 12228 به‌عنوان کنترل منفی استفاده شدند.

بررسی فنوتیپی تولید بیوفیلیم در جدایه‌های

استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس

برای بررسی توانایی تشکیل بیوفیلیم سویه‌ها از دو روش کیفی لوله‌ای (TM) و کنگورد آگار پلیت (CRA plate) و روش کمی صفحه کشت بافت (TCP) استفاده شد.

روش لوله‌ای

در این روش یک لوپ پر باکتری از کشت ۲۴ ساعته باکتری در محیط تریپتیکاز سوی براث حاوی ۱ درصد گلوکز تلقیح و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرماگذاری شد. سپس محتویات داخل لوله‌ها دور ریخته شده و با بافر نمکی فسفات (PBS) (pH:۳) شست‌وشو یافتند. پس از خشک‌شدن لوله‌ها در محیط آزمایشگاه، آنها با کریستال ویوله ۰/۱ درصد به مدت ۲۰ دقیقه رنگ‌آمیزی شدند. سپس لوله‌ها چندین بار با آب مقطر شست‌وشو داده شدند. تشکیل بیوفیلیم به صورت یک لایه رنگ‌گرفته روی سطح داخلی دیواره لوله مشاهده شد که میزان تشکیل آن به صورت بیوفیلیم قوی، بیوفیلیم متوسط و بیوفیلیم منفی گزارش شد (۱۰).

(۱). تشکیل بیوفیلیم در دو مرحله انجام می‌شود: اتصال اولیه *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* به ماتریکس پروتئینی که در وسایل پزشکی به کار گرفته شده و سپس انباشته شدن باکتری‌ها در لایه‌های مختلف و تشکیل گلیکوکالیکس که منجر به تشکیل بیوفیلیم بالغ می‌شود. پلی‌ساکارید خارج سلولی (PIA) به‌عنوان عامل اصلی در اتصالات بین سلولی به‌منظور تشکیل بیوفیلیم چندلایه *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* شناخته شده است. PIA از طریق محصولات ژن لوکوس icaADBC تولید می‌شود که از بین آنها، *icaD* و *icaA* به‌علت فعالیت آنزیمی (N استیل گلوکزآمین ترانسفراز) نقش مهم‌تری در تشکیل بیوفیلیم ناشی از این باکتری دارند (۲). براساس گزارش‌ها، مقاومت باکتریایی در فاز بیوفیلیم ۱۰۰۰ بار بیشتر از حالت پلانکتونی یا رشد آزاد همان باکتری است. چندین مکانیسم در ایجاد این مقاومت نقش دارند. اولین مکانیسم مربوط به ماتریکس پلی‌ساکاریدی است که با ایجاد یک سد فیزیکیوشیمیایی مانع از نفوذ آنتی‌بیوتیک‌ها می‌شود (۳). دومین فرضیه در رابطه با مقاومت باکتریایی در مرحله بیوفیلیمی، مربوط به سطح پایین فعالیت متابولیکی باکتری‌ها در بیوفیلیم است. از آنجایی که در قسمت‌های عمقی بیوفیلیم مواد مغذی و اکسیژن به مقدار کمتری در دسترس باکتری قرار می‌گیرد، تکثیر و رشد باکتریایی متوقف می‌شود یا در سطح پایینی انجام می‌گیرد که این حالت باعث ایجاد مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها می‌شود؛ زیرا اغلب آنتی‌بیوتیک‌ها زمانی عمل می‌کنند که باکتری در فاز رشد و تقسیم باشد (۴). فرضیه سوم ایجاد یک محیط شیمیایی تغییر یافته درون بیوفیلیم است؛ مثلاً تولید محصولات اسیدی در بیوفیلیم ممکن است با تغییر pH در فضای داخلی بیوفیلیم همراه بوده و باعث تغییر در عملکرد آنتی‌بیوتیک شود (۵). (۶). روش‌های مختلفی برای بررسی توانایی تشکیل بیوفیلیم توسط *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* وجود دارد که شامل روش‌های کیفی لوله‌ای (Tube method)، کنگورد آگار پلیت (Congo Red) (Agar) و روش کمی میکروتیتر پلیت (Micro titer plates) که روش استاندارد طلایی برای تولید بیوفیلیم است (۹-۷). به‌تازگی روش‌های مولکولی مانند PCR برای بررسی و شناخت عوامل ژنتیکی دخیل در تشکیل بیوفیلیم استفاده شده است. هدف از این بررسی حضور ژن‌های *icaD* و *icaA* در سویه‌های *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* تشکیل‌دهنده بیوفیلیم و مقایسه روش‌های فنوتیپی TM، CRA و TCP برای تشخیص و بررسی توانایی تشکیل بیوفیلیم در سویه‌های جدا شده از بیماران و افراد ناقل سالم در گرگان انجام شد.

روش کنگورد آگار پلیت

محیط کنگورد آگار با مخلوط کردن ۳۷ گرم BHI agar، ۵۰ گرم ساکارز، ۰/۸ گرم کنگورد و ۱۰ گرم آگار در ۱ لیتر آب مقطر تهیه شد. سپس محلول فوق با شرایط ۱۲۱ درجه سلسیوس، ۱۵ پوند به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو گشت. برای انجام این آزمون از کشت ۲۴ ساعته باکتری در محیط کنگورد کشت داده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه گرماگذاری شد. بعد از نگهداری پلیت‌ها به مدت ۱۸ ساعت در دمای اتاق رنگ محیط و کلنی از لحاظ تشکیل بیوفیلم بررسی شد. کلنی‌های قرمز بیوفیلم منفی، کلنی‌های قرمز روی زمینه محیط سیاه بیوفیلم + (بیوفیلم ضعیف)، کلنی‌های سیاه روی زمینه محیط قرمز بیوفیلم ++ (بیوفیلم متوسط) و کلنی‌های سیاه روی زمینه محیط سیاه بیوفیلم +++ (بیوفیلم قوی) ارزیابی شدند (۱۱).

روش میکروتیتر پلیت

برای بررسی کمی توانایی تشکیل ایزوله‌ها، این روش به کار رفت (۱۲). به‌طور خلاصه، ابتدا جدایه‌ها در محیط تریپتیکاز سوی برات حاوی ۱ درصد گلوکز به مدت ۱۸ تا ۲۰ ساعت در ۳۷ درجه انکوبه شده و سپس سوسپانسیون معادل نیم مک‌فارلند تهیه شد. پس از آن به هر چاهک الیزا ۱۰۰ میکرولیتر از این محیط اضافه کرده و میکروپلیت را در ۳۷ درجه ۲۴ ساعت انکوبه شد. پس از ۲۴ ساعت، چاهک‌ها سه بار PBS شست‌وشو یافتند تا باکتری‌های نجسبیده جدا شوند. در مرحله بعد، سایر باکتری‌های چسبیده به چاهک با ۲۵۰ μ l از اتانول ۹۶ درصد به مدت ۱۵ دقیقه فیکس شدند. سپس هر چاهک با ۲۰۰ μ l کریستال ویوله ۰/۰۲ درصد رنگ

جدول ۱. مشخصات پرایمرهای استفاده شده در مطالعه

منبع	اندازه قطعه (جفت باز bp)	توالی (5'-3')	پرایمر
(۱۴)	۱۸۸	F: TCT CTT GCA GGA GCA ATC AA R: TCA GGC ACT AAC ATC CAG CA	<i>icaA</i>
(۱۴)	۱۹۴	F: ATG GTC AAG CCC AGA CAG AG R: CGT GTT TTC AAC ATT TAA TGC AA	<i>icaD</i>

شده و پس از ۵ دقیقه رنگ با آب مقطر شسته شد. پس از خشک شدن پلیت‌ها، آنالیز کمی بیوفیلم با افزودن ۲۰۰ μ l از گلاسیال استیک اسید ۳۳ درصد به هر چاهک و خواندن OD آنها در طول موج ۴۹۲ nm توسط دستگاه الیزا محاسبه می‌شد. برای اطمینان از صحت کار، آزمایش‌های فوق ۳ بار در زمان‌های مختلف تکرار شد. در ارزیابی بیوفیلم تشکیل شده بر اساس میزان جذب نوری، نمونه‌های با OD کمتر از ۰/۱ فاقد بیوفیلم، ۰/۲-۰/۱ به عنوان بیوفیلم ضعیف، ۰/۳-۰/۲ به عنوان بیوفیلم متوسط و بیش از ۰/۳ به عنوان بیوفیلم قوی در نظر گرفته شدند (۸).

آزمون PCR برای ردیابی ژن های *icaA* و *icaD*

به منظور استخراج ماده ژنومی سوبه‌های تولیدکننده بیوفیلم از روش جوشاندن استفاده شد (۱۳). برای انجام PCR از پرایمرهای اختصاصی *icaA* و *icaD* استفاده شد (جدول ۱). واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۰/۱ میکروگرم DNA الگو، یک میکرومولار از هر پرایمر فوروارد و ریورس، ۰/۲ میلی‌مولار dNTP، ۲ میلی‌مولار $MgCl_2$ ، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR و ۱ واحد آنزیم *Taq DNA Polymerase* انجام گرفت. شرایط دمایی واکنش برای هر دو جفت پرایمر در دستگاه ترمال سایکلر بایورد (Bio-Rad, USA) تحت شرایط دمایی ۵ دقیقه واسرشت شدن اولیه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس و در ادامه ۵۰ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه، اتصال در دمای ۵۵ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ ثانیه، طویل شدن در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه و در نهایت طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه انجام گرفت (۱۴).

استانداردهای CLSI با روش انتشار دیسک بررسی شدند. ابتدا سوسپانسیون باکتری از کشت ۲۴-۱۸ ساعته در محیط نوترینت برات (شرکت مرک، آلمان) معادل نیم مک‌فارلند با غلظت نهایی $1/5 \times 10^8$ تهیه شد. سپس با استفاده از یک سوآپ استریل بر محیط مولر هینتون آگار (شرکت مرک، آلمان) در سه جهت

تعیین حساسیت باکتری به آنتی‌بیوتیک

سوبه‌های *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* از نظر مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین (۳۰ μ g)، کلرامفنیکل (۳۰ μ g) و نیتروفورانتوئین (۳۰۰ μ g)، اگزاسیلین (۱ μ g)، مینوسیکلین (۳۰ μ g) و پنی‌سیلین G (شرکت مست، انگلستان) طبق

به دست آمده از نمونه‌ها و نتایج ارزیابی‌ها در نرم‌افزار SPSS-16 وارد و با روش Chi-Square آنالیز و تجزیه و تحلیل شد و در تمامی موارد سطح معنی دار $P < 0/05$ در نظر گرفته شد. آزمون حساسیت و ویژگی، قدرت پیش‌بینی مثبت و منفی و دقت روش‌های کنگورد آگار و لوله‌ای و PCR با استفاده از رابطه‌های ریاضی به دست آمد.

یافته‌ها

مشخصات جدایه‌های بررسی شده با توجه به نوع نمونه و جنسیت بیماران در جدول ۲ ارائه شده است.

به صورت متراکم کشت داده شد. در نهایت، دیسک‌های آنتی بیوتیک با استفاده از پنس‌های استریل برداشته شده و در سطح محیط کشت باکتری قرار داده شد. پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرماگذاری و پس از ۲۴ ساعت با اندازه‌گیری هاله رشدنیافتگی اطراف دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی براساس معیارهای CLSI تفسیر شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

در این تحقیق از آمارهای توصیفی میانگین، انحراف معیار و نمودار برای توصیف داده‌ها استفاده شد. همچنین اطلاعات

جدول شماره ۲. مشخصات مربوط به سن، جنس و درصد پراکنش نوع نمونه‌ها در بین افراد ناقل و بیمار

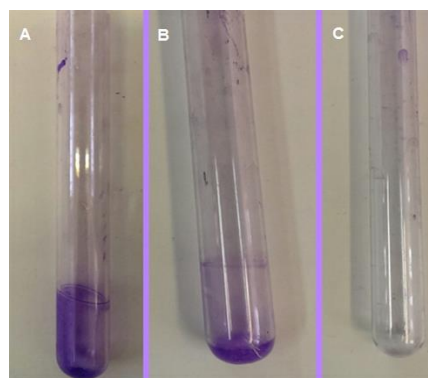
اطلاعات بیماران	ناقل (درصد)	بیمار (درصد)
جنس	مرد	۱۴ (۳۵)
	زن	۲۶ (۶۵)
	بینی	۴۰ (۱۰۰)
نوع نمونه	ادرار	۰
	خون	۰
	چشم	۰

ارزیابی تشکیل بیوفیلم با روش کنگورد آگار

نتایج حاصل از بررسی کیفی تشکیل بیوفیلم در روش کنگورد آگار در ۹۰ جدایه استافیلوکوکوس / پیدرمیدیس به دست آمده از نمونه‌های بالینی و ناقلین نشان داد که در نمونه‌های کلینیکی، ۵۵ درصد بیوفیلم منفی (کلنی‌های قرمز)، ۷ درصد بیوفیلم ضعیف (کلنی‌های قرمز روی زمینه محیط سیاه)، ۱۹ درصد بیوفیلم متوسط (کلنی‌های سیاه روی زمینه محیط قرمز) و ۲۹ درصد بیوفیلم قوی (کلنی‌های سیاه روی زمینه سیاه) بودند. در ناقلین ۳۰ درصد بیوفیلم منفی، ۳۲/۵ درصد بیوفیلم ضعیف، ۱۰ درصد بیوفیلم متوسط و ۲۷/۵ درصد بیوفیلم قوی را تشکیل دادند (شکل ۲). تفاوت معنی‌داری در نتایج حاصله بین دو گروه بیمار و ناقل مشاهده نشد.

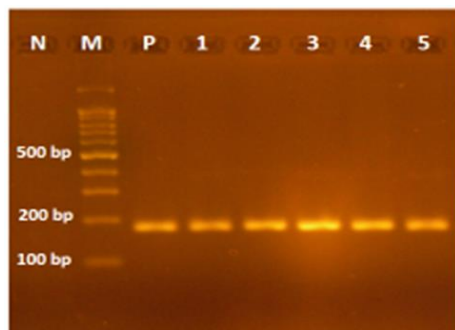
ارزیابی تشکیل بیوفیلم با روش تست لوله

نتایج حاصل از بررسی کیفی تست لوله در نمونه‌های کلینیکی ۳۶ درصد بیوفیلم قوی، ۲۲ درصد بیوفیلم متوسط و ۴۲ درصد بیوفیلم منفی بود. در نمونه‌های ناقلین ۱۵ درصد بیوفیلم قوی، ۵۵ درصد بیوفیلم متوسط و ۳۰ درصد بیوفیلم منفی بود (شکل ۱). تفاوت معنی‌داری بین دو گروه بیمار و ناقل مشاهده نشد.

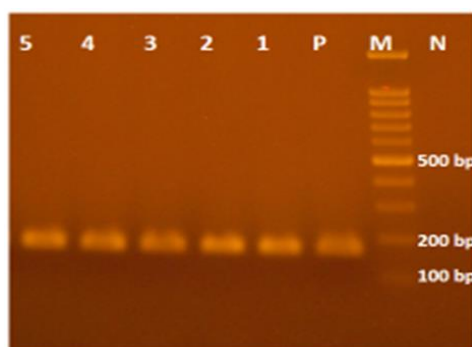


شکل ۱. نتایج بیوفیلم در تست لوله. (A) بیوفیلم قوی. (B) بیوفیلم متوسط. (C) بیوفیلم منفی

تشکیل دهنده بیوفیلم شناسایی شدند، منفی بود و یک جدایه از نمونه های ادرار با روش *icaD* PCR مثبت، اما با روش میکروتیتر پلیت منفی گزارش شد.



A



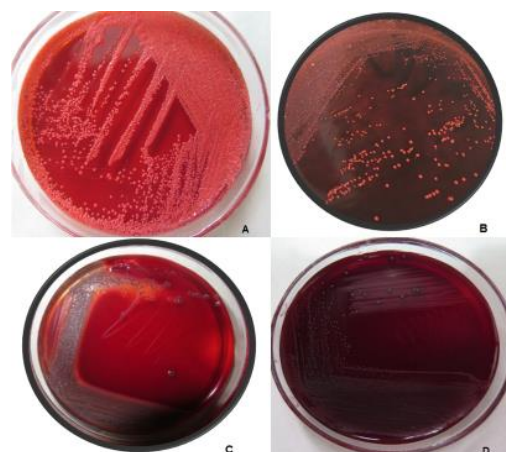
B

شکل ۴. شناسایی ژن های *icaA* (A) و *icaD* (B) در نمونه های استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس. M: ۱۰۰ bp DNA مارکر؛ N: کنترل منفی؛ P: کنترل مثبت؛ ستون ۵-۱: محصولات PCR برای ژن های اختصاصی.

مقایسه نتایج تشکیل بیوفیلم در روش های فنوتیپی و

مولکولی

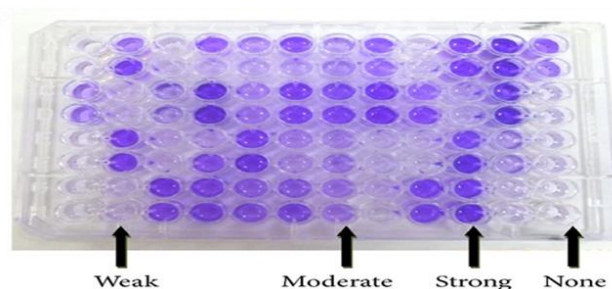
از بین ۹۰ نمونه، ۶۱ جدایه توانایی تشکیل بیوفیلم داشتند که ۵۸ جدایه با روش کنگورد آگار و ۵۷ جدایه با روش لوله ای شناسایی شدند. روش MTP به عنوان استاندارد طلایی برای ارزیابی دو روش کیفی TM و CRA استفاده شد (جدول ۳) (۹، ۱۵، ۱۶). حساسیت، ویژگی، قدرت پیش بینی مثبت، قدرت پیش بینی منفی و دقت آزمون ها با استفاده از اطلاعات جدول ۴ طبق فرمول محاسبه شد. حساسیت روش لوله ای (۹۳ درصد) از حساسیت روش کنگورد (۵۵/۷۳ درصد) بالاتر بود. حساسیت در روش PCR با استفاده از ژن *icaA* از دو روش فنوتیپی CRA و TM بالاتر (۱۰۰ درصد)، اما با استفاده از ژن *icaD* از دو روش فنوتیپی مذکور کمتر به دست آمد (۸۳/۶). دقت در روش PCR *icaA* در مقایسه با سایر روش ها بیشتر بود (جدول ۵).



شکل ۲. نتایج بیوفیلم در محیط کشت کنگورد آگار. (A) بیوفیلم منفی (کلنی های قرمز بر روی محیط قرمز)، (B) بیوفیلم ضعیف (کلنی های قرمز روی زمینه محیط سیاه)، (C) بیوفیلم متوسط (کلنی های سیاه روی زمینه محیط قرمز) و (D) بیوفیلم قوی (کلنی های سیاه روی زمینه سیاه).

ارزیابی تشکیل بیوفیلم با روش میکروتیتر پلیت

نتایج حاصل از بررسی کمی تشکیل بیوفیلم در جدایه های بالینی ۳۶ درصد فاقد توانایی تشکیل بیوفیلم، ۷ درصد بیوفیلم ضعیف، ۲۳ درصد بیوفیلم متوسط و ۳۴ درصد بیوفیلم قوی را نشان دادند. در نمونه های ناقلین ۲۷/۵ درصد بیوفیلم منفی، ۹/۵ درصد بیوفیلم ضعیف، ۶۲/۵ درصد بیوفیلم متوسط و ۵ درصد بیوفیلم قوی را تشکیل دادند (شکل ۳).



شکل ۳. تشکیل بیوفیلم در روش میکروتیتر پلیت

نتایج آزمون PCR برای ژن های *icaD* و *icaA*

آزمون PCR برای ژن *icaA* (۱۸۸ bp) در تمام نمونه های کلینیکی و ناقلین که با روش میکروتیتر پلیت توانایی تشکیل بیوفیلم داشتند مثبت بود. *icaD* (۱۹۸ bp) در ۲۵ جدایه از ناقلین (۸۶/۲ درصد) و ۲۷ جدایه از نمونه های کلینیکی (۸۴/۳۷ درصد) مثبت بود (شکل ۴). در مجموع PCR با استفاده از ژن *icaA* با روش فنوتیپی میکروتیتر پلیت همخوانی داشت و ژن *icaD* برای ۱۰ جدایه که با روش میکروتیتر پلیت به عنوان

جدول ۳. مقایسه نتایج تشکیل بیوفیلم‌ها در روش‌های فنوتیپی و مولکولی

حضور ژن در سویه‌های تشکیل دهنده بیوفیلم (درصد)		تعداد تشکیل بیوفیلم (درصد)						مشخصات (تعداد)	
<i>icaD</i>	<i>icaA</i>	لوله‌ای		کنگورد آگار		میکروتیتر پلیت			
		مثبت	منفی	مثبت	منفی	مثبت	منفی		
۲۵ (۸۶/۲)	۲۹ (۱۰۰)	۲۸ (۷۰)	۱۲ (۳۰)	۱۵ (۳۷/۵)	۲۵ (۶۲/۵)	۲۹ (۷۲/۵)	۱۱ (۲۷/۵)	بینی (۴۰)	ناقل (۴۰)
۱۶ (۱۰۰)	۱۵ (۱۰۰)	۱۴ (۵۰)	۱۴ (۵۰)	۱۱ (۳۹/۲۸)	۱۷ (۶۰/۷۲)	۱۵ (۵۳/۵۸)	۱۳ (۴۶/۴۲)	ادرار (۲۸)	
۱۰ (۶۲/۵)	۱۶ (۱۰۰)	۱۵ (۷۱/۴۳)	۶ (۲۸/۵۷)	۸ (۲۸/۵۷)	۱۳ (۴۶/۴۲)	۱۶ (۷۶/۲)	۵ (۲۳/۸)	خون (۲۱)	بیمار (۵۰)
۱ (۱۰۰)	۱ (۱۰۰)	۰	۱ (۱۰۰)	۰	۱ (۱۰۰)	۱ (۱۰۰)	۰	چشم (۱)	
۵۲ (۸۵/۲۴)	۶۱ (۱۰۰)	۵۷ (۶۳/۳۴)	۳۳ (۳۶/۶۶)	۳۴ (۳۷/۷۸)	۵۶ (۶۲/۲۲)	۶۱ (۶۷/۷۹)	۲۹ (۳۲/۲۲)	۹۰	مجموع (۹۰)

جدول ۴. تشکیل بیوفیلم با استفاده از روش‌های PCR و TCP، CRA، TM

PCR <i>icaD</i>		PCR <i>icaA</i>		لوله‌ای		کنگورد آگار		روش آزمایش	
منفی	مثبت	منفی	مثبت	منفی	مثبت	منفی	مثبت		
۱۰	۵۱	۰	۶۱	۴	۵۷	۲۷	۳۴	مثبت	میکروتیتر
۲۸	۱	۲۹	۰	۲۹	۰	۲۹	۰	منفی	پلیت

جدول ۵. آنالیز آماری روش‌های کنگورد آگار و لوله‌ای در مقایسه با روش استاندارد طلایی میکروتیتر پلیت برای تشخیص تشکیل بیوفیلم در استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس

روش‌های تشخیص بیوفیلم	حساسیت* (درصد)	ویژگی** (درصد)	قدرت پیش‌بینی مثبت*** (درصد)	قدرت پیش‌بینی منفی**** (درصد)	دقت***** (درصد)
کنگورد آگار	۵۵/۷۳	۱۰۰	۱۰۰	۵۱/۷۸	۷۰
لوله‌ای	۹۳	۱۰۰	۱۰۰	۸۷	۹۵
PCR <i>icaA</i>	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
PCR <i>icaD</i>	۸۳/۶	۹۶/۵۵	۹۸/۰۷	۷۳/۶۸	۸۷/۷۷

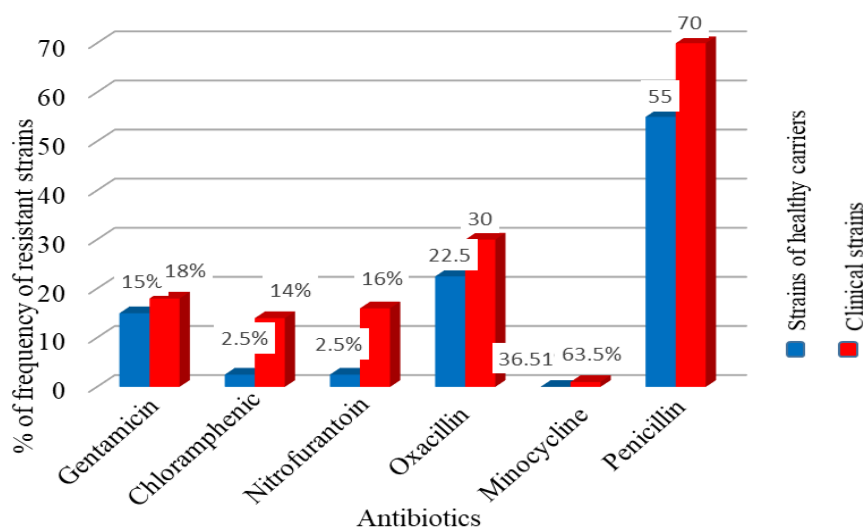
* Sensitivity, ** Specificity, *** Positive Predictive Power, **** Negative Predictive Power, ***** Accuracy

میزان تولید بیوفیلم در روش میکروتیتر پلیت
براساس مقاومت دارویی

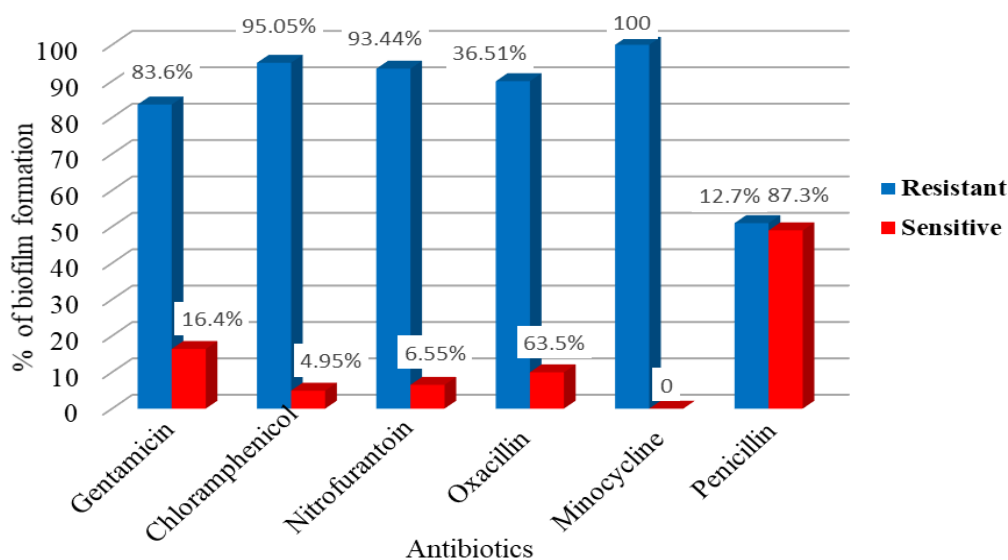
نتایج حاصل از بررسی کمی تشکیل بیوفیلم در روش میکروتیتر پلیت در ۹۰ جدایه *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* براساس مقاومت آنتی بیوتیکی در نمودار ۲ نشان داده شده است. توانایی تشکیل بیوفیلم در جدایه های مقاوم به طور معنی داری بیش از جدایه های حساس بود ($P < 0.0001$)

مقاومت جدایه های *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* به
آنتی بیوتیک های مورد مطالعه

مقایسه درصد فراوانی سویه های مقاوم به آنتی بیوتیک های مختلف در ۹۰ جدایه *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* نشان داد که میزان مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه های کلینیکی از سویه های افراد ناقل سالم بیشتر بوده است (نمودار ۱).



نمودار ۱. درصد فراوانی سویه های *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* مقاوم به آنتی بیوتیک در سویه های کلینیکی و سویه های جدا شده از افراد سالم



نمودار ۲. مقایسه مقاومت و حساسیت دارویی با میزان تولید بیوفیلم براساس روش میکروتیتر پلیت

بحث و نتیجه‌گیری

یکی از مهم‌ترین فاکتورهای که *استافیلوکوکوس* / *پیدرمیدیس* را به یک پاتوژن مهم بیمارستانی تبدیل کرده است، توانایی این باکتری در اتصال به سطوح به مواد و تجهیزات بیمارستانی و متعاقب آن، ایجاد بیوفیلم است. شناسایی سویه‌های ایجادکننده بیوفیلم *استافیلوکوکوس* / *پیدرمیدیس* با استفاده از روشی مناسب و شناخت مکانیسم‌های اتصالی آنها در تولید بیوفیلم می‌تواند به فهم درست استفاده از تجهیزات پزشکی مصنوعی و جلوگیری از افزایش مقاومت به داروها کمک کند. تاکنون روش‌های مختلفی فنوتیپی و مولکولی برای تشخیص بیوفیلم توسط باکتری‌ها استفاده شده که در بین این روش‌ها، MTP به‌عنوان روش استاندارد طلایی معرفی شده است (۱۷). در این مطالعه، توانایی تشکیل بیوفیلم با استفاده از روش‌های فنوتیپی TM، CRA، MTP و روش مولکولی PCR با استفاده از ژن‌های *icaA* و *icaD* در نمونه‌های بالینی و ناقلین بررسی شد. آزمون CRA به‌عنوان یک روش کیفی در شناسایی بیوفیلم توانست ۳۸/۷۸ درصد از جدایه‌های تولیدکننده بیوفیلم (۳۴ از ۹۰ سویه) را شناسایی کند که مشابه یافته‌های حاصل از مطالعات Arslan و همکاران (۱۸) و Satorres و همکاران (۱۹) بود که به ترتیب ۳۸/۵ و ۴۱/۳ درصد از سویه‌های تشکیل‌دهنده بیوفیلم را شناسایی کردند. در مقابل این مقادیر، گزارش‌هایی از پایین بودن توانایی CRA در ارزیابی باکتری‌های تولیدکننده بیوفیلم از سوی Kord و همکاران در ایران (۲۰) و Mathur در هند به‌دست آمده است که این روش را برای شناسایی بیوفیلم توصیه نکرده‌اند (۹). اختلاف در نتایج گزارش‌های اعلام‌شده می‌تواند به علت اختلاف در منشأ نمونه، ترکیبات و شرایط گرماگذاری متفاوت محیط CRA و تفاسیر مختلف از رنگ کلنی و محیط باشد. روش MTP علاوه بر اینکه توانایی تشکیل بیوفیلم جدایه‌ها را تشخیص می‌دهد می‌تواند میزان تشکیل بیوفیلم را به صورت کمی اندازه‌گیری کند. با استفاده از این روش، در مطالعه حاضر ۶۱ جدایه (۶۷/۷۹ درصد) بیوفیلم تشکیل دادند و ۲۹ جدایه (۳۲/۲۲ درصد) از نظر تشکیل بیوفیلم منفی بودند. نتایج حاصل از بررسی کمی تشکیل بیوفیلم در جدایه‌های بالینی ۳۶ درصد فاقد توانایی تشکیل بیوفیلم، ۷ درصد بیوفیلم ضعیف، ۲۳ درصد بیوفیلم متوسط و ۳۴ درصد بیوفیلم قوی را نشان دادند. در نمونه‌های ناقلین ۲۷/۵ درصد بیوفیلم منفی، ۹/۵ درصد بیوفیلم ضعیف، ۶۲/۵ درصد بیوفیلم متوسط و ۵ درصد بیوفیلم قوی را تشکیل دادند که مشابه یافته‌های مطالعه NTA El-Khier و همکاران بود. در این مطالعه

۳۰/۸ درصد از سویه‌ها توانایی تشکیل بیوفیلم قوی، ۱۲/۸ درصد بیوفیلم متوسط، ۷/۷ درصد بیوفیلم ضعیف داشتند (۲۱). سومین روش فنوتیپی که برای بررسی بیوفیلم ناشی از *استافیلوکوکوس* / *پیدرمیدیس* در این مطالعه استفاده شد، روش لوله‌ای بود. این روش توانست بیوفیلم را در ۵۷ جدایه (۶۳/۳۴) تشخیص دهد که در نمونه‌های کلینیکی ۳۶ درصد بیوفیلم قوی، ۲۲ درصد بیوفیلم متوسط و ۴۲ درصد بیوفیلم منفی بود. در نمونه‌های ناقلین ۱۵ درصد بیوفیلم قوی، ۵۵ درصد بیوفیلم متوسط و ۳۰ درصد بیوفیلم منفی بود. طبق نتایج مطالعه ما و در مقایسه با نتایج حاصل از روش CRA نشان داد که این روش قابلیت شناسایی بهتری دارد که موافق با نتایج حاصل از مطالعه Ruzicka و همکاران بود (۲۲). اما این روش در مقایسه با MTP برای بررسی تولید بیوفیلم، به دلیل تفاسیر مختلف از آزمایش‌ها توسط مشاهدات افراد اختلاف و تشخیص بین انواع مختلف متوسط، ضعیف و منفی، دشوار است. براساس نتایج به‌دست‌آمده از مطالعه ما و مطالعات گذشته، روش TM نمی‌تواند روشی مناسب برای غربال‌گری سویه‌های تولیدکننده بیوفیلم باشد (۱۰).

در این مطالعه، برای بررسی بیوفیلم از روش مولکولی PCR با استفاده از ژن‌های *icaA* و *icaD* استفاده شد. مشابه مطالعه Gad و همکاران (۲۳)، ژن *icaA* توانست تمامی جدایه‌های تشکیل‌دهنده بیوفیلم را شناسایی کند (۱۰۰ درصد). ژن *icaD* در ۵۲ از ۶۱ سویه تولیدکننده بیوفیلم (۸۵/۲۴ درصد) شناسایی شد که نتایج حاصله مطابق با مطالعه Kord و همکاران بود (۲۰). در مطالعه حاضر، یکی از سویه‌های *icaD* مثبت توانایی تشکیل بیوفیلم را در روش‌های فنوتیپی نداشت که این نشان‌دهنده آن است که تولید بیوفیلم همیشه وابسته به این ژن‌ها نیست. به‌طور مشابهی در مطالعه Oliveira و همکاران یکی از سویه‌های *استافیلوکوکوس* / *پیدرمیدیس* که در روش MTP تولیدکننده قوی بیوفیلم بود، حامل هیچ‌کدام از ژن‌های *ica* نبود (۲۴). مطالعات مختلفی گزارش کرده‌اند که حضور برخی ژن‌های خاص مانند *aap* و *bhp* در بعضی از سویه‌های *استافیلوکوکوس* / *پیدرمیدیس* منفی در بروز این پدیده نقش دارد (۲۵، ۲۶). در مطالعه حاضر، سویه‌هایی وجود داشتند که با وجود مثبت بودن ژن‌های *icaA* و *icaD* توانایی تشکیل بیوفیلم را در روش‌های فنوتیپی نداشتند. یک دلیل برای تشکیل نشدن بیوفیلم در این سویه‌ها می‌تواند نداشتن *icaC* باشد. طبق بررسی‌های انجام‌شده تغییرات فنوتیپی می‌تواند به علت جهش‌های حذفی یا اضافی در اپرون *ica* باشد که باعث غیرفعال شدن ژن‌های *ica* می‌شود (۲۱). طبق یافته‌های

دیسک دیفیوژن بررسی شد، میزان مقاومت دارویی در سویه‌های بالینی از سویه‌های ناقلین بیشتر بود که از این نظر با مطالعه Kozitskaya و همکاران مطابقت دارد (۲۸). همچنین بررسی تولید بیوفیلم براساس مقاومت دارویی نشان داد که سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک توانایی بیشتری در تولید بیوفیلم دارند.

مطالعه حاضر با مقایسه بین روش‌های فنوتیپی و روش‌های مولکولی با استفاده از ژن‌های *icaD* و *icaA* برای تشخیص بیوفیلم نشان داد که MTP روش مناسبی برای تشخیص بیوفیلم با بیشترین حساسیت و اختصاصیت است و استفاده هم‌زمان آن با روش‌های مولکولی توصیه می‌شود.

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله از همکاری دانشگاه آزاد اسلامی، دانشگاه علوم پزشکی، آزمایشگاه‌ها و بیمارستان‌های آموزشی - درمانی شهرستان گرگان کمال تشکر و قدردانی را دارند.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

Ziebuhr و همکاران وارد شدن *IS256* در اپرون *ica* باعث غیرفعال‌سازی ژن *icaA* و فقدان تشکیل بیوفیلم در روش‌های فنوتیپی است (۲۷). مقایسه بین روش‌های فنوتیپی و روش‌های مولکولی با استفاده از ژن‌های *icaA* و *icaD* برای تشخیص بیوفیلم در مطالعه ما نشان داد که MTP بهترین روش برای تشخیص بیوفیلم با بیشترین حساسیت و اختصاصیت است و استفاده هم‌زمان آن با روش‌های مولکولی توصیه می‌شود.

از بین ۹۰ جدایه /ستافیلوکوکوس/پیدرمیدیس، ۲۹ جدایه از ناقلین (۳۲/۲۲ درصد) و ۳۲ جدایه (۳۳/۵۵ درصد) از نمونه‌های کلینیکی توانایی تشکیل بیوفیلم را داشتند که با مطالعات گذشته مطابقت دارد. از بین ۵۰ نمونه بالینی با منشأ چشم، خون و ادرار، نمونه‌های کشت خون با درصد (۷۶/۲) دارای بیشترین توانایی در تشکیل بیوفیلم بود. در بررسی‌های Kozitskaya و همکاران در آلمان روی /ستافیلوکوکوس/پیدرمیدیس، مشخص شد که از بین نمونه‌های بالینی مورد مطالعه، سویه‌های جدا شده از کشت خون با بالاترین درصد (۸۷ درصد) بیشترین توانایی در تولید بیوفیلم را داشتند که از این نظر با مطالعه ما مطابقت داشت (۲۸). در مطالعه حاضر، مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌ها با استفاده از روش

References

- Otto M. Staphylococcus epidermidis—the 'accidental' pathogen. *Nat Rev Microbiol*. 2009; 7(8): 555. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2182>
- Mack D, Becker P, Chatterjee I, Dobinsky S, Knobloch JK, Peters G, Rohde H, Herrmann M. Mechanisms of biofilm formation in Staphylococcus epidermidis and Staphylococcus aureus: functional molecules, regulatory circuits, and adaptive responses. *Int J Med Microbiol*. 2004; 294(2-3): 203-12. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2004.06.015>
- Ciofu O, Mandsberg LF, Wang H, Høiby N. Phenotypes selected during chronic lung infection in cystic fibrosis patients: implications for the treatment of Pseudomonas aeruginosa biofilm infections. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2012; 65(2): 215-25. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2012.00983.x>
- Høiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents*. 2010; 35(4): 322-32. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2009.12.011>
- Bazzaz BS, Khameneh B, Zarei H, Golmohammadzadeh S. Antibacterial efficacy of rifampin loaded solid lipid nanoparticles against Staphylococcus epidermidis biofilm. *Microbial pathogenesis*. 2016; 93: 137-44. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2015.11.031>
- Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 1999; 284(5418): 1318-22. <https://doi.org/10.1126/science.284.5418.1318>
- De Silva GD, Kantzanou M, Justice A, Massey RC, Wilkinson AR, Day NP, Peacock SJ. The *ica* operon and biofilm production in coagulase-negative staphylococci associated with carriage and disease in a neonatal intensive care unit. *Journal of clinical microbiology*. 2002; 40(2): 382-8. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.02.382-388.2002>
- Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, Baddour LM, Barrett FF, Melton DM, Beachey EH. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *Journal of clinical microbiology*. 1985; 22(6): 996-1006.
- 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. <https://doi.org/10.4103/0255-0857.19890>

10. Christensen GD, Simpson WA, Bisno AL, Beachey EH. Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infection and immunity*. 1982; 37(1): 318-26.
11. Freeman DJ, Falkiner FR, Keane CT. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *J Clin Pathol*. 1989; 42(8): 872-4. <https://doi.org/10.1136/jcp.42.8.872>
12. Mortazavi H, Nakhaei Moghaddam M, Abadi NS. Study of the Effect of Silver Nanoparticles on Biofilms Formation by *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences*. 2015; 14(2): 125-36.
13. Rahimi F, Bouzari M, Maleki Z, Rahimi F. Antibiotic susceptibility pattern among *Staphylococcus* spp. with emphasis on detection of *mecA* gene in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolates. *Iranian Journal of Clinical Infectious Diseases*. 2009; 4(3).
14. Arciola CR, Baldassarri L, Montanaro L. Presence of *icaA* and *icaD* Genes and slime production in a collection of *Staphylococcal* strains from catheter-associated infections. *Journal of clinical microbiology*. 2001; 39(6): 2151-6. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.6.2151-2156.2001>
15. Panda PS, Chaudhary U, Dube SK. Comparison of four different methods for detection of biofilm formation by uropathogens. *Indian J Pathol Microbiol*. 2016; 59(2): 177. <https://doi.org/10.4103/0377-4929.182013>
16. Hassan A, Usman J, Kaleem F, Omair M, Khalid A, Iqbal M. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. *Braz J Infect Dis*. 2011; 15(4): 305-11. [https://doi.org/10.1016/S1413-8670\(11\)70197-0](https://doi.org/10.1016/S1413-8670(11)70197-0)
17. Deka N. Comparison of Tissue Culture plate method, Tube Method and Congo Red Agar Method for the detection of biofilm formation by Coagulase Negative *Staphylococcus* isolated from Non-clinical Isolates. *Int J Curr Microbiol App Sci*. 2014; 3(10): 810-5.
18. Arslan S, Özkardes F. Slime production and antibiotic susceptibility in staphylococci isolated from clinical samples. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2007; 102(1): 29-33.
19. Satorres SE, Alcaráz LE. Prevalence of *icaA* and *icaD* genes in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from patients and hospital staff. *Cent Eur J Public Health*. 2007; 15(2): 87-90.
20. Kord M, Ardebili A, Jamalán M, Jahanbakhsh R, Behnampour N, Ghaemi EA. Evaluation of Biofilm Formation and Presence of *Ica* Genes in *Staphylococcus epidermidis* Clinical Isolates. *Osong Public Health Res Perspect*. 2018; 9(4): 160. <https://doi.org/10.24171/j.phrp.2018.9.4.04>
21. El-Khier NTA, El-Kazzaz SS, Elganainy AE. Phenotypic and Genotypic Detection of Biofilm Formation in *Staphylococcus epidermidis* Isolates from Retrieved Orthopaedic Implants and Prostheses. *Br Microbiol Res J*. 2015; 9(4): 1-10. <https://doi.org/10.9734/BMRJ/2015/18650>
22. Růžička F, Hola V, Votava M, Tejkalova R, Horvát R, Heroldová M, Woznicová V. Biofilm detection and the clinical significance of *Staphylococcus epidermidis* isolates. *Folia Microbiol*. 2004; 49(5): 596.
23. Gad GF, El-Feky MA, El-Rehewy MS, Hassan MA, Abolella H, El-Baky RM. Detection of *icaA*, *icaD* genes and biofilm production by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* isolated from urinary tract catheterized patients. *J Infect Dev Ctries*. 2009; 3(05): 342-51.
24. Oliveira A, Maria de Lourdes RS. Comparison of methods for the detection of biofilm production in coagulase-negative staphylococci. *BMC Res Notes*. 2010; 3(1): 260. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-3-260>
25. Rohde H, Burdelski C, Bartscht K, Hussain M, Buck F, Horstkotte MA, Knobloch JK, Heilmann C, Herrmann M, Mack D. Induction of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation via proteolytic processing of the accumulation-associated protein by staphylococcal and host proteases. *Molecular microbiology*. 2005; 55(6): 1883-95.
26. Tormo MA, Knecht E, Götz F, Lasa I, Penades JR. Bap-dependent biofilm formation by pathogenic species of *Staphylococcus*: evidence of horizontal gene transfer?. *Microbiology*. 2005; 151(7): 2465-75. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27865-0>
27. Ziebuhr W, Krimmer V, Rachid S, Löbner I, Götz F, Hacker J. A novel mechanism of phase variation of virulence in *Staphylococcus epidermidis*: evidence for control of the polysaccharide intercellular adhesin synthesis by alternating insertion and excision of the insertion sequence element IS256. *Molecular microbiology*. 1999; 32(2): 345-56. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01353.x>
28. Kozitskaya S, Cho SH, Dietrich K, Marre R, Naber K, Ziebuhr W. The bacterial insertion sequence element IS256 occurs preferentially in nosocomial *Staphylococcus epidermidis* isolates: association with biofilm formation and resistance to aminoglycosides. *Infection and immunity*. 2004; 72(2): 1210-5. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.2.1210-1215.2004>