

ارتباط با بیماری زایی - توانایی تولید بیوفیلم - استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس جدا شده از نمونه بالینی

شهین نجاریپیرایه^۱ (Ph.D)، علی جزایری مقدس^{۲*} (Ph.D)، بیتا بخشی^۱ (Ph.D)

۱- گروه باکتری‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲- گروه باکتری‌شناسی و ویروس‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران

چکیده

هدف از این مطالعه استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس به عنوان یک بیماری زای است. نتیجه قرار می‌گیرد که توانایی این باکتری در ایجاد عفونت با قابلیت آلودگی تولید بیوفیلم - ارتباط می‌باشد. برخی استافیلوکوکوس‌های سطحی این باکتری به بیوتاد هسپین - در اتصال باکتری به سطوح پوشیده شده از پلاستیک یا سطوح پلی‌تری این‌های نشانی می‌مایند. هدف این مطالعه یافتن ارتباط بین این ارتباط با بیماری زایی - توانایی تولید بیوفیلم - اسکوپي در این گونه‌های استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس - است.

در روش‌های این مطالعه بر روی ۵۹ نمونه استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس که از نمونه‌های بیمارستانی، ترارشه و تخم‌بیران - متری در یکی از بیمارستان‌های تهران جدا شده‌اند - انجام شده است. استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس - ۱۱ نمونه از آزمایشات باکتری‌شناسی - شناسایی گردید. توانایی تولید بیوفیلم - اسکوپي - روش میکروبیات - رسی - وجود ژن‌های *fbe, icaA, IS256, aap, bhp* - ژن‌ها از واکنش زنجیره‌ای - راز - مشخص گردید.

افته‌ها: از ۵۹ نمونه - بررسی ۳۶ - رد (۶۱٪) قادر به تولید بیوفیلم - اسکوپي - که از این تعداد ۳۳ - رد (۹۱٪) - اجد ژن *fbe* - ۳۲ - رد (۸۸٪) - اجد ژن *icaA* - ۲۸ - رد (۷۷٪) - اجد *IS256* - ۲۶ - رد (۷۲٪) - اجد ژن *aap* - ۷ - رد (۱۹٪) - اجد ژن *bhp* - ۳۶ - رد (۶۱٪) - اجد ژن *fbe* - اسکوپي - ۱۲ - رد (۳۳٪) تولید کننده قوی بیوفیلم - اند.

نتیجه‌گیری: یافته‌های این تحقیق حاکی از این است که توانایی تولید بیوفیلم - اسکوپي - در عوامل بیماری‌زایی - ربط می‌باشد. حضور این باکتری قادر به تولید بیوفیلم می‌باشد که نهایتاً - به کلونیزه شدن و بقای باکتری - بدن می‌باشد. اتفاقی که در شرایط - فسیل - مایمی یا - متری - بدن بیمار زمینه‌ساز عفونت - در صورت وجود - آنتی‌بیوتیکی - است - است - جدی - رای - بیمار - داشت.

اژه‌ها - کلیدی - استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، عامل بیماری‌زایی، بیوفیلم

مقدمه

استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و سایر استافیلوکوک‌های کوآگولاز منفی به عنوان باکتری‌های بیماری‌زای فرصت‌طلب و

هم‌چنین فلور طبیعی پوست انسان مورد توجه قرار گرفته‌اند [۲،۱]. استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس به عنوان آلوده‌کننده کشت خون و عامل عفونت بیمارستانی در باکتری‌می‌حاد،

می تواند تحت تاثیر ورود IS256 به لوکوس ica قرار بگیرد که منجر به تاثیر بر تولید PIA گردیده بر تشکیل بیوفیلم و تهاجم به سیستم ایمنی ایفای نقش نماید [۱۴،۸] Bhp (Bap (biofilm-associated homologous protein) که مشابه (Bap protein) در استافیلوکوکوس اورئوس می باشد در برخی سویه های استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس بیان می شود و در اتصال بیوفیلم نقش ایفا می کند [۱۱]. Aap (Accumulation association protein) که یک پروتئین خارج سلولی ۱۴۰ کیلودالتونی است برای تجمع در سطوح پلیمری و تشکیل بیوفیلم ضروری است [۱۵]. استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس می تواند به کمک fbe که یک پروتئین سطحی است و در این باکتری به وفور یافت می شود، با فیبرینوزن واکنش نماید. آنتی بادی بر علیه fbe می تواند از اتصال باکتری به کاتترهای پوشیده شده از فیبرینوزن جلوگیری نموده و از ایجاد عفونت در مدل های حیوانی ممانعت نماید [۱۶]. وجود ارتباط بین حضور عوامل مرتبط با بیماری زایی و توانایی تشکیل بیوفیلم در استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس جدا شده از موارد عفونت بیانگر قابلیت این باکتری برای استقرار در میزبان، ایجاد بیوفیلم و متعاقب آن ایجاد عفونت به ویژه در بیماران در معرض این عفونت باکتریال می باشد.

این مطالعه با هدف بررسی ارتباط توانایی تولید بیوفیلم ماکروسکوپی و وجود عوامل مرتبط با بیماری زایی شامل icaA, IS256, aap, bhp, fbe در استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس جدا شده از موارد عفونت در نمونه های بالینی انجام شده است.

مواد و روش ها

این مطالعه های ۲۰۰۰ بررسی ۵۹ ایزوله استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس جدا شده از موارد عفونت در بیماران بستری بخش مراقبت های ویژه یکی از بیمارستان های آموزشی تهران که با روش نمونه برداری آسان جمع آوری شده بود، مورد شناسایی قرار گرفت که ۵۰ ایزوله از نمونه خون، ۴ ایزوله از

عفونت های مرتبط با کاتتر و عفونت های متعاقب استفاده از وسایل خارجی در بدن شناخته می شود. توانایی این باکتری در تشکیل بیوفیلم باعث ایجاد عفونت به ویژه در افراد دارای سیستم ایمنی ضعیف و بیماران استفاده کننده از وسایل مصنوعی در بدن می گردد. بیوفیلم یک تجمع باکتریایی چندلایه و چسبنده است که به سختی برداشته می شود [۴،۳]. برخی مواد ضد عفونی کننده از قبیل اتانول و ایزوپروپانول می توانند بر تولید بیوفیلم تاثیرگذار باشند [۵]. در شرایط بی هوازی توانایی تولید بیوفیلم در استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس به طور قابل توجهی بیش تر از استافیلوکوکوس اورئوس می باشد [۶]. باکتری هایی که در بیوفیلم قرار دارند در حال رشد نیستند در نتیجه مقاومت قابل توجهی نسبت به آنتی بیوتیک ها در مقایسه با حالت تکی از خود نشان می دهند [۷-۹]. استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس پروتئین های دیواره سلولی را به عنوان مکانیسمی برای اتصال به بافت میزبان و همچنین پروتئین هایی که سطح میزبان را می پوشانند، به کار می برد که برای اتصال باکتری و تهاجم به سیستم ایمنی لازم است [۱۰-۱۲] Polysaccharide intracellular adhesion (PIA) که توسط اپرن ica تولید می شود، موجب اتصال سلول به سلول و تنظیم تشکیل بیوفیلم می گردد. مطالعات حاکی از این است که icaA نقش مهمی در تولید بیوفیلم توسط استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و استافیلوکوکوس اورئوس ایفا می کند [۱۳]. دو مرحله اصلی در تشکیل بیوفیلم استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس رخ می دهد: اتصال به ماتریکس پروتئینی که در سطح وسایل پزشکی به کار گرفته شده وجود دارد و سپس تولید و تجمع آدهسین پلی ساکاریدی خارج سلولی (PIA) که توسط اپرن ica تولید می شود [۱۴] IS256 یک عنصر ژنتیکی متحرک است که در اغلب موارد کپی های متعدد آن در ژنوم استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس وجود دارد و قادر به تاثیرگذاری بر ژن های مرتبط با بیماری زایی است این عنصر ژنتیکی متحرک موجب تطابق باکتری با محیط های مختلف می گردد و به عنوان یکی از عوامل مرتبط با بیماری زایی در سویه ها مهاجم شناخته می گردد. بیان ژن ica

به مدت ۵ دقیقه رنگ آمیزی شد، با آب مقطر شستشو داده شد و در دمای محیط خشک گردید. به هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر محلول نمک طعام ۰/۹٪ اضافه و جذب نوری در ۴۹۰ نانومتر توسط دستگاه الزا ریدر قرائت گردید. یک چاهک بدون اضافه کردن باکتری و یک چاهک با استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس ATCC 12228 به عنوان کنترل منفی استفاده شد. مقدار جذب نوری کنترل منفی برابر ۰/۱۲۵ می باشد، مقادیر بین ۰/۱۲۶ تا ۰/۹۰ به عنوان تولیدکننده ضعیف بیوفیلم و مقادیر بالاتر از ۰/۹۰ به عنوان تولیدکننده قوی بیوفیلم در نظر گرفته شدند.

۱- استخراج DNA ابتدا چند کلنی جوان باکتری در ۲۰۰

میکرولیتر بافر (TE (10Mm TrisHCl+1Mm EDTA مخلوط گردید، سپس ۲۰ میکرولیتر لیزواستافین با غلظت ۲ میکروگرم در میلی لیتر به آن اضافه شد و یک ساعت در دمای محیط نگهداری گردید و ۱۰ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی گراد و ۵ دقیقه روی یخ قرار داده شد و این فرآیند تکرار گردید. سپس در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد و از مایع رویی برای انجام PCR استفاده گردید. برای ارزیابی DNA استخراج شده از اسپکتروفوتومتر (با استفاده از UV استفاده شد Eppendorf, BioPhotometer (Germany)) و جذب نوری آن را در ۲۶۰ نانومتر و ۲۸۰ نانومتر اندازه گرفتیم. چنانچه نسبت ۲۶۰ به ۲۸۰ بین ۱/۸ تا ۲ باشد مناسب است، نسبت کم تر نشانه آلودگی با پروتئین و نسبت بیش تر نشانه آلودگی با RNA می باشد.

۲- رسی -۱- ژن های *icaA*, *IS256*, *aap*, *bhp*, *fbe*

شرایط واکنش زنجیره ای پلی مرز و پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ ذکر شده اند. سویه استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس ATCC 12228 به عنوان کنترل مثبت *aap* و کنترل منفی *icaA* و سویه استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس K28 به عنوان کنترل مثبت *fbe* استفاده شد. واکنش زنجیره ای پلی مرز در دستگاه MJ mini. Gradient thermal cycler PTC-1148. (U.S.A) انجام گردید و برای مشاهده از الکتروفورز در آگارز ۱٪ اشعه UV استفاده شد.

نمونه ادرار، ۴ ایزوله از نمونه لوله تراشه و یک ایزوله از نمونه زخم جدا شده بودند.

تعین هویت این رله ها برای شناسایی و تایید هویت این ایزوله ها نمونه روی محیط کشت ژلوز خوندار که با استفاده از خون گوسفند تهیه شده بود کشت داده شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردید. کلنی ها استافیلوکوک سفید رنگ، از نوع صاف و با اندازه متوسط هستند، پس از انجام رنگ آمیزی گرم برای کلنی های مشکوک و مشاهده کوکسی گرم مثبت، آزمایش کاتالاز انجام گردید و کلنی های کاتالاز مثبت در محیط کشت مانیتول سالت آگار کشت داده شدند. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی گراد از کلنی هایی که تخمیر مانیتول انجام نداده بودند و تغییر رنگ در محیط به وجود نیامده بود، آزمایش کوآگولاز لوله ای با پلاسماي خرگوش انجام شد. سویه های گوآگولاز منفی که قادر به ایجاد لخته در لوله آزمایش نبودند، از نظر وجود آنزیم اوره آز، تخمیر قند مانوز، تخمیر قند مالتوز و عدم تخمیر قند ترهالوز بررسی شدند. استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس قادر به تولید اوره آز، تخمیر مانوز و مالتوز می باشد در حالی که قادر به تخمیر ترهالوز نیست در نتیجه لوله حاوی اوره و لوله حاوی ترهالوز قرمز رنگ، لوله حاوی مانوز و لوله حاوی مالتوز زرد رنگ خواهند شد [۱۸،۱۷].

رسی -۲- انسانی تولید بیوفیلم -۱- سکوپپی از روش میکروتیتر پلیت شرح داده شده توسط Los و همکاران [۱۹] استفاده گردید. باکتری مورد نظر در محیط کشت Trypticase soy broth حاوی ۰/۵٪ گلوکز و ۴٪ نمک طعام به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در شرایط هوای انکوبه گردید. رقت ۱:۲۰۰ تهیه و ۲۰۰ میکرولیتر از آن در چاهک های پلیت ۹۶ استریل خانه ریخته شد و پس از انکوباسیون به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در شرایط هوای، چاهک ها تخلیه و با بافر فسفات [۷] mM Na₂HPO₄, 3 mM NaH₂PO₄, 130 mM [۷] NaCl (pH 7.4) استریل سه بار شستشو داده شده به صورت وارونه قرارداده شد تا خشک گردد. سپس با سافرانین ۰/۲۵٪

۵۱/۴٪ CI: ۹۵٪). از ۳۶ تولیدکننده بیوفیلم ماکروسکوپی تعداد ۳۳ مورد (۹۱/۷٪) واجد ژن fbe، ۳۲ مورد (۸۸/۹٪) واجد ژن icaA، ۲۶ مورد (۷۲/۲٪) واجد ژن aap و ۷ مورد (۱۹/۴٪) واجد ژن bhp بودند. از ۳۶ ایزوله تولیدکننده بیوفیلم ماکروسکوپی ۱۲ مورد (۳۳/۳٪) تولیدکننده قوی بیوفیلم بودند. فراوانی هر یک از ژنوتیپ‌ها و توانایی تولید بیوفیلم در ایزوله استفایلوکوکوس اپیدرمیدیس مورد بررسی در جدول ۲ و فراوانی ژنوتیپ icaA+ در ایزوله‌های تولیدکننده بیوفیلم و غیر تولیدکننده بیوفیلم در جدول ۳ نشان داده شده است.

آ: مون آماری برای تجزیه و تحلیل نتایج این تحقیق و مقایسه نتایج با سایر پژوهش‌های انجام شده از کای اسکور و فاصله اطمینان ۹۵٪ استفاده شد.

نتایج

از ۵۹ ایزوله استفایلوکوکوس اپیدرمیدیس مورد بررسی با روش میکروتیتربلیت ۳۶ مورد (۶۱٪) قادر به تولید بیوفیلم ماکروسکوپی بودند (۴۸/۶٪ و ۷۳/۴٪ CI: ۹۵٪) و ۲۳ مورد (۳۹٪) قادر به تولید بیوفیلم ماکروسکوپی نبودند (۲۶/۶٪ و

جدول ۱. برابرها و شرایط واکنش زنجیره ای پلی مرز

Target gene	Forward/Reverse	PCR condition	Ampicon size (bp)	reference
icaA	5-TCGATGCGATTTGTTCAAACAT-3/ 5-CTGTTTCATGGAAACTC-3	5min,95°C; 30 cycles of 30s, 94°C; 30s, 52°C;50s,72°C; final extension, 4min, 72°C	215	This study
IS256	5-CCAGTTCATTTGGGTTTATAGC-3/ 5-CATATACATGGCAAGCTCTAGG-3	5min,95°C; 30 cycles of 30s, 94°C; 30s, 52°C;50s,72°C; final extension, 4min, 72°C	251	This study
aap	5-AAACGGTGGTATCTTACGTGAA-3/ 5-CAATGTTGCACCATCTAAATCAGCT-3	5min,94°C; 30 cycles of 30s, 94°C; 30s, 60°C;50s,72°C; final extension, 4min, 72°C	465	(3)
bhp	5-ATGGTATTAGCAAGCTCTCAGCTGG-3/ 5-AGGGTTTCCA TCTGGATCCG-3	5min,94°C; 30 cycles of 30s, 94°C; 30s, 61°C; 90s,72°C; final extension, 4min,72°C	1585	(3)
fbe	5-CTACAAGTTCAGGTCAAGGACAAGG-3/ 5-GCGTCGGCGTATATCCTTCAG-3	5min,94°C; 30 cycles of 30s, 94°C; 30s, 60°C;50s,72°C; final extension, 4min, 72°C	273	(3)

جدول ۲. فراوانی ژنهای مورد بررسی و توانایی تولید بیوفیلم ماکروسکوپی در ایزوله های بالینی استفایلوکوکوس اپیدرمیدیس

Genotype	Ability of macroscopic biofilm formation			Total (n=59)
	SP	P	NP	
bhp+icaA+IS256+aap+fbe+	2	1		3
bhp+icaA+IS256+ fbe+		4		4
icaA+IS256+aap+ fbe+	10	6		16
icaA+IS256+ fbe+		3		3
icaA+aap+ fbe+		2		2
IS256+aap+ fbe+		2	8	10
bhp+icaA+		1		1
icaA+aap+		2		2
bhp+ fbe+		1		1
icaA+ fbe+		1	1	2
IS256+ fbe+			5	5
aap+ fbe+			4	4
fbe+		1	3	3
IS256+			2	2
aap+		1		1

SP: Strong biofilm producer, P: Biofilm producer, NP: Non biofilm producer

جدول ۳. فراوانی ژنوتیپ icaA+ در ایزوله های قادر به تولید بیوفیلم و غیر قادر به تولید بیوفیلم

Genotype	Biofilm producer (n=36)	Non biofilm producer (n=23)	Total (n=59)
icaA+	32	1	33
icaA-	4	22	26

بحث و نتیجه گیری

در سال‌های اخیر استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس به عنوان یکی از عوامل باکتریال عفونت بیمارستانی شناخته شده است. برخی عوامل زمینه‌ساز این امر عبارتند از: افزایش تعداد افرادی که سیستم ایمنی ضعیف دارند، استفاده از وسایل خارجی در بدن و استفاده بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها و ضد عفونی‌کننده‌ها. توانایی تولید بیوفیلیم یکی از راه‌هایی است که باکتری می‌تواند از عوامل محیطی فرار نموده به عنوان ایجادکننده عفونت بیمارستانی مطرح شود [۲۲-۲۰]. برخی اقدامات از قبیل پوشش سطح وسایل خارجی با آنتی‌بیوتیک یا موادی که باکتری نتواند به آن متصل شود می‌تواند از تولید بیوفیلیم توسط باکتری جلوگیری نماید [۲۳]. توانایی تولید بیوفیلیم به باکتری کمک می‌کند تا خود را از دسترس سیستم ایمنی و عوامل ضد باکتریایی حفاظت نموده، عفونت‌های مزمن را به وجود آورد. آدهسین‌های باکتریایی به عنوان عوامل بیماری‌زایی که موجب عفونت در ارتباط با وسایل خارجی که سطح آن‌ها از پروتئین‌های میزبان پوشیده شده، شناخته می‌شوند [۲۴، ۱۳]. تولید Polysaccharide intracellular adhesion (PIA) که توسط پروتئین *ica* کد می‌شود و حضور توالی الحاقی IS256 دو شاخص مهم برای تهاجم استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس می‌باشند [۱]. رونوشت‌برداری و تولید زیاد accumulation associated protein (aap) که یکی از آدهسین‌های مهم محسوب می‌شود و برای توسعه بیوفیلیم ضروری است می‌تواند موجب تولید بیوفیلیم مستقل از PIA شود [۱۱، ۱۸].

در این مطالعه از ۵۹ ایزوله بالینی استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، ۶۱٪ قادر به تولید بیوفیلیم ماکروسکوپی بودند که ۸۸/۹٪ واجد *icaA* بودند (۸۰/۹ و ۹۶/۹ CI: ۹۵٪)، این یافته به طور معنی‌دار از میزان گزارش شده (۱۰۰٪) توسط Gad و همکاران [۱۳] کم‌تر است. Aricola و همکاران [۱۰] گزارش نموده‌اند که ۸۷٪ از ایزوله‌های *icaA* + قادر به تولید بیوفیلیم ماکروسکوپی بوده‌اند، نتایج بررسی حاضر نشان‌دهنده این است که ۹۷٪ از ایزوله‌های *icaA* + قادر به تولید بیوفیلیم

می‌باشند (۹۱/۲ و ۱۰۰ CI: ۹۵٪) که به طور معنی‌دار از نتایج بررسی Aricola و همکاران بیش‌تر است. در بررسی حاضر تمامی ایزوله‌هایی که ژنوتیپ *icaA+aap+* داشتند قادر به تولید بیوفیلیم ماکروسکوپی بودند که به طور معنی‌دار از نتیجه تحقیق انجام شده توسط Liduma و همکاران [۲۵] که این میزان را ۶۰/۶٪ گزارش نموده‌اند بیش‌تر است ولی با ۹۱٪ گزارش شده توسط Los و همکاران [۱۹] فاقد اختلاف معنی‌دار می‌باشد. در بررسی حاضر یک ایزوله با ژنوتیپ *icaA-IS256-aap-bhp+* قادر به تولید بیوفیلیم ماکروسکوپی بود که نیاز به بررسی بیش‌تر با سویه‌های *bhp* + دارد. نتایج بررسی حاضر حاکی از این است که ژنوتیپ *icaA* + تاثیر معنی‌دار بر تولید بیوفیلیم ماکروسکوپی در مقایسه با ژنوتیپ - *icaA* دارد ($P=0/001$).

نتایج تحقیق حاضر حاکی از این است که حضور عوامل مرتبط با بیماری‌زایی به‌ویژه *icaA* با توانایی تولید بیوفیلیم ماکروسکوپی مرتبط است. حضور این عوامل در استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس این باکتری را قادر می‌سازد تا تولید بیوفیلیم نموده، موجب استقرار و بقای باکتری در بدن بیمار شود و در شرایطی که سیستم ایمنی بدن ضعیف باشد یا هنگام بستری شدن فرد در بیمارستان با ایجاد عفونت باعث ایجاد مشکلاتی برای بیمار به‌ویژه در صورت وجود مقاومت آنتی‌بیوتیکی شود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از کارکنان گروه باکتری‌شناسی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس نهایت تشکر و سپاس‌گزاری خود را به جهت همکاری برای انجام این مطالعه ابراز می‌دارند.

منابع

- [1] Otto M. Staphylococcus epidermidis—the accidental pathogen. Nat Rev Microbiol 2009; 7: 555-567.
- [2] Sani NA, Sapri HF, Neoh Hm, Hussin S. First report on the molecular epidemiology of Malaysian

and *Staphylococcus epidermidis* isolated from urinary tract catheterized patients. *J Infect Dev Ctries* 2009; 3: 342-351.

[14] Koskela A, Nilsson-Augustinsson Å, Persson L, Söderquist B. Prevalence of the *ica* operon and insertion sequence IS256 among *Staphylococcus epidermidis* prosthetic joint infection isolates. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2009; 28: 655-660.

[15] Bowden MG, Chen W, Singvall J, Xu Y, Peacock SJ, Valtulina V, et al. Identification and preliminary characterization of cell-wall-anchored proteins of *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology* 2005; 151: 1453-1464.

[16] Rohde H, Frankenberger S, Zähringer U, Mack D. Structure, function and contribution of polysaccharide intercellular adhesin (PIA) to *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation and pathogenesis of biomaterial-associated infections. *Eur J Cell Biol* 2010; 89: 103-111.

[17] Forbes BA, Sahn DF, Weissfeld AS. Study guide for bailey & scott's diagnostic microbiology: Mosby; 2007.

[18] Sharon J. Peacock. *Staphylococcus*. In: Topley wilson's Microbiology & Microbial Infections. 10th ed. Hodder Arnold. 2005; p: 771-816.

[19] Los R, Sawicki R, Juda M, Stankevic M, Rybojad P, Sawicki M, et al. A comparative analysis of phenotypic and genotypic methods for the determination of the biofilm-forming abilities of *Staphylococcus epidermidis*. *FEMS Microbiol Lett* 2010; 310: 97-103.

[20] Pourmand MR, Abdossamadi Z, Salari MH, Hosseini M. Slime layer formation and the prevalence of *mecA* and *aap* genes in *Staphylococcus epidermidis* isolates. *J Infect Dev Ctries* 2010; 5: 34-40.

[21] Büttner H, Mack D, Rohde H. Structural basis of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation: mechanisms and molecular interactions. *Front Cell Infect Microbiol* 2015; 5.

[22] Decker R, Burdelski C, Zobiak M, Büttner H, Franke G, Christner M, et al. An 18 kDa scaffold protein is critical for *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation. *PLoS Pathog* 2015; 11: e1004735.

[23] Arciola CR, Campoccia D, Ehrlich GD, Montanaro L. Biofilm-based implant infections in orthopaedics. *Adv Exp Med Biol* 2015; 830: 29-46.

[24] Speziale P, Pietrocola G, Foster TJ, Geoghegan JA. Protein-based biofilm matrices in *Staphylococci*. *Front Cell Infect Microbiol* 2014; 4: 171.

[25] Līduma I, Tračevska T, Bērs U, Žileviča A. Phenotypic and genetic analysis of biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis*. *Medicina (Kaunas, Lithuania)* 2011; 48: 305-309.

Staphylococcus epidermidis isolated from a University Teaching Hospital. *BMC Res Notes* 2014; 7: 597.

[3] Rohde H, Kalitzky M, Kröger N, Scherpe S, Horstkotte MA, Knobloch JK, et al. Detection of virulence-associated genes not useful for discriminating between invasive and commensal *Staphylococcus epidermidis* strains from a bone marrow transplant unit. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 5614-5619.

[4] Namvar AE, Bastarahang S, Abbasi N, Ghehi GS, Farhadbakhtiaran S, Arezi P, et al. Clinical characteristics of *Staphylococcus epidermidis*: a systematic review. *GMS Hyg Infect Control* 2014; 9.

[5] Luther MK, Bilida S, Mermel LA, LaPlante KL. Ethanol and isopropyl alcohol exposure increases biofilm formation in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Dis Ther* 2015: 1-8.

[6] Asai K, Yamada K, Yagi T, Baba H, Kawamura I, Ohta M. Effect of incubation atmosphere on the production and composition of staphylococcal biofilms. *J Infect Chemother* 2015; 21: 55-61.

[7] Tabin UF, Betrisey B, Bohner M, Ilchmann T, Trampuz A, Clauss M. Staphylococcal biofilm formation on the surface of three different calcium phosphate bone grafts: a qualitative and quantitative in vivo analysis. *J Mater Sci Mater Med* 2015; 26: 1-8.

[8] Pinheiro L, Brito CI, Pereira VC, Oliveira Ad, Camargo CH, Cunha MdLRd. Reduced susceptibility to vancomycin and biofilm formation in methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* isolated from blood cultures. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2014; 109: 871-878.

[9] Arciola CR, Campoccia D, Speziale P, Montanaro L, Costerton JW. Biofilm formation in *Staphylococcus* implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials. *Biomaterials* 2012; 33: 5967-5982.

[10] Arciola CR, Campoccia D, Gamberini S, Donati ME, Montanaro L. Presence of fibrinogen-binding adhesin gene in *Staphylococcus epidermidis* isolates from central venous catheters-associated and orthopaedic implant-associated infections. *Biomaterials* 2004; 25: 4825-4829.

[11] Otto M. Molecular basis of staphylococcus epidermidis infections. *Semin Immunopathol* 2012; 34: 201-214.

[12] Arciola CR, Campoccia D, Ravaioli S, Montanaro L. Polysaccharide intercellular adhesin in biofilm: structural and regulatory aspects. *Front Cell Infect Microbiol* 2015; 5.

[13] 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*

Staphylococcus epidermidis virulence factor and ability of macroscopic biofilm production

Shahin Najar-Peerayeh (Ph.D)¹, Ali Jazayeri Moghadas (Ph.D)^{*2}, Bita Bakhshi(Ph.D)¹

1 – Dept. of Bacteriology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

2 – Dept. of Bacteriology and Virology, School of Medicine, Semnan University of Medical sciences, Semnan, Iran

(Received: 12 Oct 2015; Accepted: 11 Apr 2016)

Introduction: *Staphylococcus epidermidis* is considered to be an important opportunistic pathogen. *S. epidermidis* ability to cause infection is due to its biofilm formation ability. Several bacterial molecules act as *S. epidermidis* adhesion objects and play role in bacterial adhesion to protein or polymeric surfaces. This study aimed to determine the correlation of virulence factors and macroscopic biofilm formation in *S. epidermidis* clinical isolates.

Materials and Methods: A cross-sectional study was conducted including 59 *S. epidermidis* obtained from blood, urine, tracheal and wound samples in Tehran, Iran. *S. epidermidis* was identified by conventional bacteriological tests. Phenotypic biofilm formation assay was done by microtiter plate method. The virulence associated genes including *icaA*, *IS256*, *aap*, *bhp* and *fbe* were detected by specific PCR.

Results: From 59 isolates 36 (61%) were able to produce macroscopic biofilm, of which 12(33.3%) were strong biofilm producers. Of the 36 biofilm producers, 32 (88.9%) were positive for *icaA*. The majority of the isolates carried *fbe* (91.7%), *IS256* (77.8%), *aap* (72.2%), while *bhp* was presented only in (15.3%).

Conclusion: This study demonstrated that the presence of virulence factors is correlated with macroscopic biofilm production. The presence of these virulence factors enables *S. epidermidis* to produce biofilm, colonize and survive in patients. In the case of immune system compromising or hospitalized patients, infections can occur and would be more complicated than the antibiotic resistance cases.

Keywords: *Staphylococcus epidermidis*, Virulence Factors, Biofilm

* Corresponding author. Tel: +98 23 33654162

alijazayeri@semums.ac.ir