

Çeşitli Klinik Enfeksiyonlardan Elde Edilen *Staphylococcus aureus* İzolatlarında İnsersiyon Sekansı IS256'nın Biofilm Oluşumu Üzerine Etkisi *

The Role of Insertion Sequence IS256 In Biofilm Formation Among Various Clinical Samples of Staphylococcus aureus Isolates

Ebru Us¹, Alper Tekeli¹, İştah Dolapçı¹, Z.Ceren Karahan¹, Banu Sancak², Gülşen Haşçelik²

¹ Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
² Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

* "Bu çalışma, 2-5 Eylül 2009 tarihinde Roma'da düzenlenen "First European Congress on Microbial Biofilms (Eurobiofilms 2009)" isimli kongrede poster olarak sunulmuştur.

Ica (intersellüler adezyon) operonunu kodlayan enzimler tarafından polisakkarit intersellüler adezin (PIA) üretimi, stafilokoklardaki biofilm gelişiminin şu ana kadar en iyi anlaşılmiş mekanizmasıdır. IS256, *ica* operonuna geri dönüşümlü olarak eklenmek suretiyle *ica* operonu ekspresyonunu ve sonrasında da biyofilm oluşumunu etkileme kapasitesine sahip mobil bir elemandır. Bu çalışmanın amacı 1998-2004 yılları arasında çeşitli klinik örneklerden elde edilen 207 *Staphylococcus aureus* izolatında insersiyon sekansı IS256'nın biofilm oluşumu üzerine etkisini araştırmaktır. 1998-2004 yılları arasında Ankara ve Hacettepe Üniversitelerinde yatan hastalara ait çeşitli klinik örneklerden elde edilen 207 *S. aureus* izolatı (kan, kateter, solunum yolu örnekleri, steril vucut sıvıları, yara, balgam, idrar, püvy) çalışmaya dahil edildi. Çalışılan suşların 28'i (%13.5) metisilin duyarlı (MSSA), 133'ü (%64.2) metisilin dirençli (MRSA), 46'sı (%22.2) ise hetero-VISA (vankomisine heterojen olarak orta duyarlı *S. aureus*) suşlarını içeren izolatlar idi. Stafilokok kültürlerinden genomik DNA ekstrakte edildikten sonra amplifikasyon kalıbı olarak kullanıldı. Biyofilm genleri (*icaA*, *icaD*) ve IS256'yı saptamak amacıyla simpleks PCR lar yapıldı. 207 suş içinde *icaA* pozitifliği %89.4 (185 izolat), *icaD* pozitifliği %97.1 (201 izolat), biofilm genlerinin her ikisinin de pozitifliği: %88.9 (184 izolat), sadece birinin pozitifliği %8.7 (18 izolat) oranında bulundu. Biyofilm genleri (*ica*) MRSA ve hVISA izolatlarında, MSSA izolatlarına göre daha yüksek oranda saptandı ($p < 0.001$). IS256 pozitifliği hVISA suşlarında MRSA'dan, MRSA suşlarında ise MSSA'dan daha yüksek oranda tesbit edildi ($p < 0.001$) Biyofilm pozitiflik prevalansı IS256 içeren suşlarda anlamlı derecede yüksek bulundu ($p < 0.001$), bu da *S. aureus*'un klinik izolatlarında IS256'nın *ica* operonu ekspresyonunu etkileyerek biyofilm oluşumuna yol açtığını düşündürdü.

Anahtar Sözcükler: **Biyofilm, S. aureus, icaA, icaD, IS256**

Biofilms consist of a cell-multilayer embedded in a slime matrix and they are the basis for production of polysaccharide adhesion by *ica*-operon-encoded enzymes is currently the best understood mechanism of biofilm development in staphylococci. The insertion sequence IS256, a mobile element frequently associated to transposons has the capacity to influence expression of the *ica* operon and subsequent biofilm formation by reversible insertion into the *ica* operon. We aimed to elucidate the role of insertion sequence IS256 in biofilm formation among various *Staphylococcus aureus* isolates from clinical specimens of hospitalized patients at Ankara and Hacettepe Universities. A total of 207 *S. aureus* strains isolated between 1998 and 2004 from clinical specimens were included in the study. A total of 28 of the *S. aureus* isolates studied were methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA), 133 were methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA), and 46 were vancomycin-intermediate *S. aureus* (hetero-VISA) isolates. Genomic DNA was extracted from staphylococcal cultures and used as an amplification template with the primers in simplex PCRs for detection of biofilm genes (*icaA*, *icaD*), IS256. Of all *S. aureus* isolates studied 185 (89.4%) were positive for *icaA*, 201 (97.1%) were positive for *icaD*, 184 (88.9%) were positive for both whereas 18 (8.7%) strains were positive for only one of them. We found the positivity rates of biofilm genes (*ica* genes) among MRSA and hetero-VISA isolates were significantly higher than those among MSSA isolates ($p < 0.001$). IS256 positivity among MRSA and hetero-VISA isolates were also significantly higher than those among MSSA isolates ($p < 0.001$). Biofilm genes among IS256 positive *S. aureus* isolates were found significantly higher than those among IS256 negative *S. aureus* isolates ($p < 0.001$). IS256 have the capacity to influence expression of the *ica* operon and subsequent biofilm formation.

Key Words : **Biyofilm, S. aureus, icaA, icaD, IS256**

Başvuru tarihi: 26.10.2009 • Kabul tarihi: 04.11.2009

İletişim

Uz. Dr. Ebru Us
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Tel : 0312 310 30 10 / 264
E-Posta Adresi: eus@medicine.ankara.edu.tr

Slime matriks içine gömülü hücre tabakalarından oluşan biyofilmler, inatçı ve kronik enfeksiyonların temelini oluştururlar. *Ica* (intersellüler adez-

yon) operonunu kodlayan enzimler tarafından polisakkarit intersellüler adezin (PIA) üretimi, stafilokoklardaki biyofilm gelişiminin şu ana kadar en iyi

anlaşılmış mekanizmasıdır. PIA, *ica-ADBC* gen grubunun ürünüdür ve biofilm oluşumu sırasında hücreler arası iletişimi sağlar (1). *Ica ADBC* hem *Staphylococcus aureus*, hem *Staphylococcus epidermidis*'te bulunan bir operondur(2). Özellikle *icaA* ve *icaD* *S. aureus* ve *S. epidermidis*'deki slime üretimi açısından önemli role sahiptir (3). *S. aureus* ilişkili enfeksiyonlar KNS (Kaogulaz Negatif Stafillokok)'ler ile ilişkililerden daha yüksek morbidite ve mortaliteye sahiptir. *S. aureus*'un biofilm oluşturması nosokomiyal enfeksiyonlara katkı sağlayan primer faktördür(4).

IS256, *ica* operonuna geri dönüşümlü olarak eklenmek suretiyle *ica* operonu ekspresyonunu ve sonrasında da biofilm oluşumunu etkileme kapasitesine sahip mobil bir elemandır. Slime üretiminin ve biofilm oluşumunun düzenlenmesinde rol oynar (5,6) IS256 tarafından gerçekleştirilen kromozomal rearanjmanın *S. epidermidis*'deki biofilm oluşumunu değiştirdiği gösterildi (7); *ica* gen grubuna IS256'nın insersiyon ve eksizyonu *S. aureus*'un biofilm fazlarında değişme ile sonuçlanır (8) ve IS256'nın varlığı *S. epidermidis*'deki biofilm oluşumu ile olduğu kadar aminoglikozid (AG) direnci ile de ilişkili bulunmuştur (9). Muhtemelen AG direnç geni ile IS256 genellikle aynı stafillokokkal transpozonda bulunmaktadır (10,11)

SCC*mec* ve IS256, *ica* operonunu içeren spesifik *S. epidermidis* klonlarında beraber bulunur ve hastane ortamını tercih eder (11). IS256 aynı zamanda patojenite ile ilişkili genlerin ekspresyonunu etkiler ve IS256'nın multipl kopyaları *S. epidermidis* genomunu

değişen çevre koşullarına daha uyumlu ve adapte hale getirir (12). Bu nedenle IS256 invaziv suşlarda bulunan virulans ilişkili bir gen gibi görünmektedir (9,12).

Örnek olarak IS256'nın eklenmesiyle *tcaA* geni inaktive olarak *S. aureus*'daki glikopeptid direncini artırır (13). Bunun yanı sıra IS256'nın transpozisyonu *S. aureus*'daki mutant *llm* geninin transkripsiyonunu arttıran yeni bir hibrid protomerin oluşmasını sağlar (14).

Bu çalışmanın amacı 1998-2004 yılları arasında çeşitli klinik örneklerden elde edilen 207 *S. aureus* izolatında insersiyon sekansı IS256'nın biofilm oluşumu üzerine etkisini araştırmaktır.

Materyal, Metod

1998-2004 yılları arasında Ankara ve Hacettepe Üniversitelerinde yatan hastalara ait çeşitli klinik örneklerden elde edilen 207 *S. aureus* izolatı (kan, kateeter, solunum yolu örnekleri, steril vucut sıvıları, yara, balgam, idrar, püye) çalışmaya dahil edildi. Çalışılan suşların 28'i (%13.5) metisilin duyarlı (MSSA), 133'ü (%64.2) metisilin dirençli (MRSA), 46'sı (%22.2) ise hetero-VISA (vankomisine heterojen olarak orta duyarlı *S. aureus*) suşlarını içeren izolatlar idi.

Stafillokok kültürlerinden genomik DNA ekstrakte edildikten sonra amplifikasyon kalıbı olarak kullanıldı. Biyofilm genleri (*icaA*, *icaD*) ve IS256'yı saptamak amacıyla Tablo 1'de tanımlanan primerler kullanılarak simpleks PCR lar yapıldı. Son hacim 50 µl olacak şekilde hazırlanan PCR reaksiyon karışımı 3 mM MgCl₂, 50 pmol ile-

ri primer, 50 pmol geri primer her bir dNTP'den 200'er mM ve 1.5 U Taq DNA polimeraz ve 5 µl genomik DNA örneği içermektedir. DNA amplifikasyonu DNA termal döngü cihazında (Techne, UK) gerçekleştirildi. Termal döngü şartları: *icaA* ve *icaD* için; 92°C de 3 dk lık ilk denatürasyonunun ardından, 30 sikluluk amplifikasyon basamağı (92°C de 45 sn denatürasyon, 49°C de 45 sn annealing ve 72°C de 1 dk uzama) ve 72°C de 7 dk inkubasyon olacak şekilde ayarlandı (15).

IS256 için; 94°C de 3 dk ilk denatürasyonunun ardından, 30 sikluluk amplifikasyon basamağı (94°C de 45 sn denatürasyon, 55°C de 45 sn annealing ve 72°C de 1 dk uzama) ve 72°C de 7 dk inkubasyon olacak şekilde ayarlandı (15 nolu kaynağın modifikasyonu ile).

PCR ürünleri elektroforez ile %2'lik agaroz jelde (Serva, Germany) UV ışığı altında incelendi.

DNA büyüklük belirteci olarak *icaA* ve IS256 için O'GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder (Fermentas, Lithuania), *icaD* için ise O'GeneRuler™ 50bp DNA Ladder (Fermentas, Lithuania) kullanıldı.

Bulgular

207 suş içinde *icaA* pozitifliği %89.4 (185 izolat), *icaD* pozitifliği %97.1 (201 izolat), biofilm genlerinin her ikisinin de pozitifliği: %88.9 (184 izolat), sadece birinin pozitifliği %8.7 (18 izolat) oranında bulundu (Şekil 1, 2).

Biyofilm genleri MRSA ve hVISA izolatlarında, MSSA izolatlarına göre daha yüksek oranda saptandı (Tablo 2).

Tablo 1. Kullanılan primerler ve annealing ısıları

Hedef gen	Primer dizisi	PCR annealing ısı (C°)	Amplikon büyüklüğü (bp)	Referans
<i>icaA</i>	5'-CCTAACTAACGAAAGGTAG-3'	49	1315	Vasudevan ve ark (15)
	5'-AAGATATAGCGATAAGTGC-3'			
<i>icaD</i>	5'-AAACGTAAGAGAGGTGG-3'	49	381	Vasudevan ve ark. (15)
	5'-GGCAATATGATCAAGATAC-3'			
IS256	5'-TGA AAA GCGAAG AGA TTC AAAGC-3'	55	1102	Montanaro ve ark. (10)
	5'-ATG TAG GTC CAT AAG AAC GGC-3'			

207 suşun 154'ünde (%74.4) IS256 pozitifliği tesbit edildi (Şekil 3).

IS256 pozitifliği hVISA suşlarında MRSA'dan, MRSA suşlarında ise MSSA'dan daha yüksek oranda tesbit edildi ($p < 0.001$) (Tablo 3).

IS256(+)/*icaA*,D(+) suş sayısı 148 (%71.5), IS256(-)/*icaA*,D(-) suş sayısı 3 (%1.4), *icaA*,D(+)/ IS256(-) suş sayısı 36 (%17.4), *icaA*,D(-)/ IS256(+) suş sayısı 2 (%1) olarak tesbit edildi.

IS256 pozitifliği, biofilm genleri pozitifliği ile doğru orantılı bulundu (Tablo 4).

İstatistiksel İncelemeler

İstatistiksel değerler Pearson Chi-Square testiyle yorumlandı, $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Tartışma

Biyofilm pozitif *S. aureus* suşları, biyofilm negatiflere göre daha çeşitli klinik ortamlardan izole edilir(16). Biyofilmler inatçı enfeksiyonlarla ilişkilidir (4) ve planktonik hücrelere göre antibiyotik-

lere daha az duyarlıdır. Bu azalmış direnç: (i) antibiyotiğin biyofilm içine yetersiz girişi; (ii) biyofilm içinde gömülü olan bakterilerin üreme oranının azalması; ve (iii) düşman bir çevredeki hücrelerin hayatta kalabilmesi için gerekli olan metabolik durumların biyofilm içindeki değişiminin çok çeşitli olması ile ilişkilidir. Bu faktörlerin kombinasyonu biyofilm ilişkili bakterilerin antimikrobiyal direnç kapasitesini artırır(17).

Önceki çalışmalarla uyumlu olarak izolatlarımızın çoğunda (184/207 %88.9), *ica* lokusunun varlığı tesbit edildi. *ica* gen lokusunun araştırılması virulan ve nonvirulan suşların ayrılmasında en güvenilir yöntemdir. İnvaziv suşların çoğunda *mecA* varlığı ile *ica* lokusu varlığı bir arada bulunmaktadır(18).

IS256, stafilokokların genetik uyumunda, çevresel adaptasyonlarında ve global düzenleyici gen ekspresyonunda rol oynamaktadır. Muhtemelen suşların genotipik ve fenotipik adaptasyonunu arttırmaktadır ve virulansla ilişkilidir (10). *S.epidermidis*'lerde yapılan

çalışmalarda IS256, kommensal izolatlarda nadirken, invaziv suşlarda tipik olarak bulunmaktadır (9, 19)

Koskela ve ark.nın (20) çalışmasında PCR ile tesbit edilen IS256 insersiyon sekanı prostetik eklem enfeksiyonu (PEE) izolatlarının çoğunda gösterildi (%81). IS256 taşıyan PEE izolatlarının %58'inin (15/26) aynı zamanda *ica* operonunu da taşıdığı, yani *ica* operonu ve IS256'nın birarada bulunma oranının %94 (15/16) olduğu belirlendi. İlaveten kan kültürlerinden (13), KIT (Kemik İliği Transplantasyonu) hastalarından (19), düşük doğum ağırlıklı yenidoğanlardan (21) izole edilen *S. epidermidis*'lerin sırasıyla %87, %94, ve %67 oranlarında IS256 taşıdığına gösterildiği çalışmalar vardır. Bizim suşlarımızda ise 207 suşun 154'ünde (%74.4) IS256 pozitifliği tesbit edildi ve diğer çalışmalarla uyumlu bulundu. Biyofilm genleri MRSA ve hVISA izolatlarında, MSSA izolatlarına göre daha yüksek oranda saptandı.

IS256, MSSA larda daha düşük, MRSA ve hVISA suşlarında istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde daha yüksek oranda bulundu. Bu verilerin ışığı altında IS256 antibiyotik direncinde rol oynuyor diyebiliriz. Bizim sonuçlarımızla uyumlu olacak şekilde Kwon ve ark.nın (6) çalışmasında 66 MRSA izolatının 54'ü (%81.8), 35 MSSA suşunun 14'ü (%40) IS256 pozitif bulundu ($p < 0.001$).

Montanaro ve ark. (10) bizim bulgularımızla uyumlu olarak klinik izolatlarda biofilm oluşumu ile IS256 varlığı arasında (doğru orantılı) kuvvetli ilişki buldu. 70 izolatın içinde 31 IS256-pozitif/*ica*- pozitif, 3 IS256- pozitif / *ica*-negatif, 6 IS256- negatif /*ica*- pozitif, 30 IS256- negatif /*ica*- negatif suş saptadı. Bizim çalışmamızda IS256(+)/*icaA*,D(+) suş sayısı 148 (%71.5), IS256(-)/*icaA*,D(-) suş sayısı 3 (%1.4), *icaA*,D(+)/ IS256(-) suş sayısı 36 (%17.4), *icaA*,D(-)/ IS256(+) suş sayısı 2 (%1) olarak tesbit edildi. İtalya'da Petrelli ve ark. nın (1) yaptığı kateter ilişkili enfeksiyonlardan izole edilen

Tablo 2. Biofilm genlerinin gruplara göre dağılımı

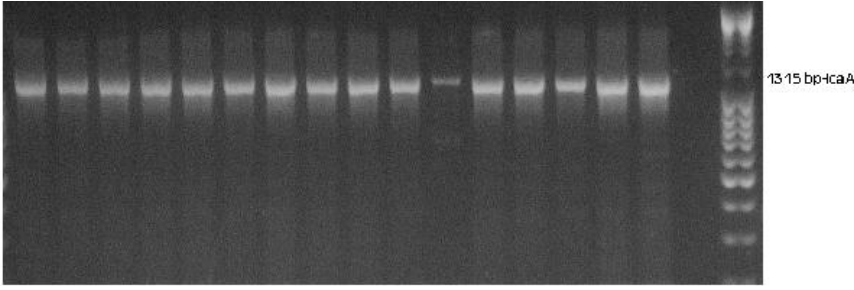
gruplar	<i>icaA</i> pozitifliği (%no)	<i>P</i> değeri	<i>icaD</i> pozitifliği (%no)	<i>P</i> değeri	<i>icaAD</i> pozitifliği (%no)	<i>P</i> değeri
MSSA	64.3 (18)		89.3 (25)		60.7 (17)	
MRSA	91.7 (122)	<0.001	98.5 (131)	=0.029	91,7 (122)	<0.001
hVISA	97.8 (45)		97.8 (45)		97.8 (45)	
toplam	89.4 (185)		97.1 (201)		88.9 (184)	

Tablo 3. IS256 pozitifliğinin MSSA, MRSA ve hVISA suşlarındaki dağılımı

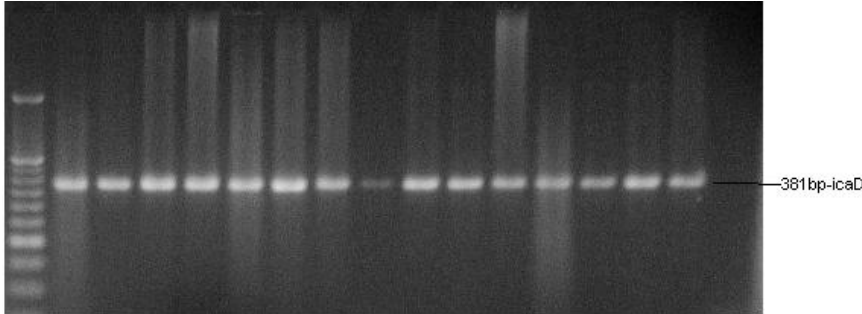
gruplar	IS256 pozitifliği (%)	<i>P</i> değeri
MSSA	3.6	
MRSA	80.5	<0.001
hVISA	100.0	
toplam	74.4 (154)	

Tablo 4. IS256 ile biofilm genlerinin ilişkisi

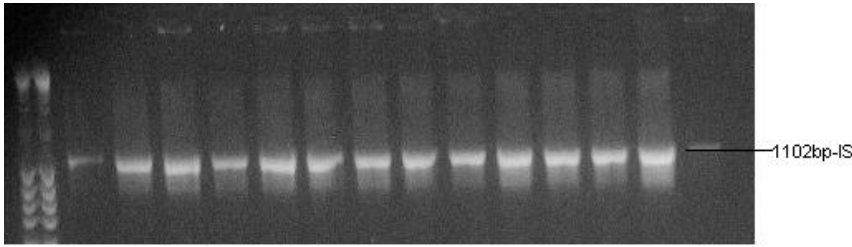
gruplar	<i>IcaA</i> pozitif(%)	<i>P</i> değeri	<i>IcaD</i> pozitif(%)	<i>P</i> değeri	<i>IcaA,D</i> pozitif(%)	<i>P</i> değeri
IS256 negatif	69.8		92.5		17.4 (36)	
IS256 pozitif	96.1	<0.001	98.7	=0.039	71.5 (148)	<0.001



Şekil 1. icaA lokusuna ait PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforezi



Şekil 2. icaD lokusuna ait PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforezi



Şekil 3. IS256'ya ait PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforezi

S. epidermidis suşlarında yapılan bir çalışmaya göre *ica* operonunu taşıyan suşların çoğu aynı zamanda genomlarında *mecA* ve IS256'yı da bulmuyordu. IS256, *icaADBC*+suşlarda daha çok bulunuyordu. *icaADBC*+izolatların % 79'u IS256'yı da taşıyor, *icaADBC*-lerin de % 40'ı IS taşıyordu (anlamli fark var). Bu veriler IS256'nın varlığının *icaADBC* operon ekspresyonunu etkileyen faktörlerden biri oldu-

ğunu doğrulamaktadır (1).

Bizim çalışmamızda biyofilm genleri (*icaA*, *icaD*) pozitif, IS256 negatif suşlar tüm suşların %17.4 ünü (36 suş), biyofilm genleri (*icaA*, *icaD*) pozitif, IS256 pozitif suşlar tüm suşların %71.5 unu (148) oluşturuyordu. Biyofilm pozitiflik prevalansı IS256 içeren suşlarda anlamli derecede yüksek bulundu ($p < 0.001$), bu da *S. aureus*'ün klinik izo-

latlarında biyofilm gelişiminin IS256 varlığına bağlı olduğunu düşündürdü.

Çalışmamızda biyofilm genleri MRSA izolatlarında, MSSA izolatlarına göre daha yüksek oranda saptandı. Kwon ve ark.nın (6) çalışmasında da benzer şekilde MRSA suşları, MSSA'lara göre polistiren kültür plaklarındaki biyofilm pozitifliği ile anlamli derecede ilişkili bulundu. Bu sonuçlar da MRSA biyofilminin MSSA biyofilminden daha kalın olduğunu tanımlayan Jones ve ark. nın (22) morfolojik çalışmasıyla uyumlu bulundu. Her iki çalışmada da test edilen MRSA suşları ile IS256 varlığı arasında anlamli ilişki tesbit edildi. Bu sonuç, MRSA suşuna IS256'nın transpozisyonu ile mutant *llm* geninin transkripsiyonunu arttıran yeni bir hibrid promotomerin oluştuğunu düşündüren önceki çalışmalara dayanarak (14) IS256'nın kromozom içine transpozisyonu veya rearanjmanının *S. aureus*'ün metisilin direncine katkı sağlaması ile açıklanabilir (6).

Sonuç olarak çalışmamızda IS256 pozitifliği, biyofilm genleri pozitifliği ile doğru orantılı bulundu. IS256 geni, düzenleyici rolü göz önüne alındığında biyofilm oluşumunu artırıyor denebilir. Eğer bir kere stafilokokkal biyofilm oluşursa; hücreler neredeyse hasarlanmaz hale gelirler, immun sistem tarafından kaplanarak antibiyotik tedavisine direnç gösterirler. Bu nedenle biyofilm oluşumunun çeşitli yönlerini anlamak çok önemlidir. Ancak ondan sonra kronik enfeksiyonlardaki stafilokokkal dirençle baş etmek için daha spesifik yollar geliştirilebilir (23).

KAYNAKLAR

1. Petrelli D, Zampaloni C, D'Ercole S, et al. Analysis of different genetic traits and their association with biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* isolates from central venous catheter infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2006, 25:773-81.
2. Cramton SE, Gerke C, Schnell NE, et al (1999) The intercellular adhesion (*ica*) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. *Infect Immun* 1999; 67:5427-33
3. 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; 39:2151-6.

4. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999;284:1318–22.
5. Conlon KM, Humphreys H, O’Gara JP. Inactivations of *rsbU* and *sarA* by IS256 represent novel mechanisms of biofilm phenotypic variation in *Staphylococcus epidermidis*. *J Bacteriol* 2004;186:6208–19.
6. Kwon AS, Park GC, Ryu SY, et al Higher biofilm formation in multidrug-resistant clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Int J Antimicrob Agents* 2008; 32:68–72
7. Ziebuhr W, Dietrich K, Trautmann M, et al M. Chromosomal rearrangements affecting biofilm production and antibiotic resistance in a *Staphylococcus epidermidis* strain causing shunt-associated ventriculitis. *Int J Med Microbiol* 2000;290:115–20.
8. Kiem S, Oh WS, Peck KR, et al. Phase variation of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* by IS256 insertion and its impact on the capacity adhering to polyurethane surface. *J Korean Med Sci* 2004;19:779–82.
9. Kozitskaya S, Cho SH, Dietrich K, et al The bacterial insertion sequence element IS256 occurs preferentially in nosocomial *Staphylococcus epidermidis* isolates: association with biofilm formation and resistance to aminoglycosides. *Infect Immun* 2004;72:1210–15.
10. Montanaro L, Campoccia D, Pirini V, Antibiotic multiresistance strictly associated with IS256 and *ica* genes in *Staphylococcus epidermidis* strains from implant orthopedic infections. *J Biomed Mater Res A* 2007 1;83:813–8
11. Kozitskaya S, Olson ME, Fey PD, et al Clonal analysis of *Staphylococcus epidermidis* isolates carrying or lacking biofilm-mediating genes by multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol* 2005;43:4751–7.
12. Gu J, Li H, Li M, et al Bacterial insertion sequence IS256 as a potential molecular marker to discriminate invasive strains from commensal strains of *Staphylococcus epidermidis*. *J Hosp Infect* 2005; 61:342–348
13. Maki H, McCallum N, Bischoff M, et al *tcaA* inactivation increases glycopeptide resistance in *Staphylococcus aureus*. *Anti microb Agents Chemother* 2004;48:1953–9.
14. Maki H, Murakami K. Formation of potent promoters of the mutant *llm* gene by IS256 transposition in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 1997;179:6944–8.
15. Vasudevan P, Nair MK, Annamalai T, et al Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. *Vet Microbiol* 2003;92:179–85.
16. Ammendolia MG, Rosa RD, Montanaro L, et al Slime production and expression of the slime-associated antigen by staphylococcal isolates. *J Clin Microbiol* 1999;37:3235–8.
17. Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 2001;358:135–8.
18. Frebourg NB, Lefebvre S, Baert S, et al PCR-based assay for discrimination between invasive and contaminating *Staphylococcus epidermidis* strains. *J Clin Microbiol* 2000; 38:877–80
19. Rohde H, Kalitzky M, Kröger N, 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; 42:5614–19
20. Koskela A, Nilsdotter-Augustinsson A, Persson L, et al Prevalence of the *ica* operon and insertion sequence IS256 among *Staphylococcus epidermidis* prosthetic joint infection isolates. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2009;28:655–60.
21. Bradford R, Abdul Manan R, Daley AJ, et al Coagulase-negative staphylococci in very-low-birth-weight infants: inability of genetic markers to distinguish invasive strains from blood culture contaminants. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2006; 25:283–90.
22. Jones SM, Morgan M, Humphrey TJ, et al H. Effect of vancomycin and rifampicin on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms. *Lancet* 2001;357:40–1.
23. Götz F. *Staphylococcus* and biofilms. *Mol Microbiol* 2002;43:1367–78.