
ACCIÓN DE DESINFECTANTES SOBRE LA PRODUCCIÓN DE BIOPELÍCULAS DE CEPAS DE *Staphylococcus aureus* PROVENIENTES DE MANIPULADORES DE ALIMENTOS

Mujica Isabel, Zabala Irene, Rivera Jhoandry
Laboratorio de Genética y Biología Molecular
Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia

Resumen

El *Staphylococcus aureus* es considerado en la industria de alimentos como un peligro biológico causante de toxiinfecciones, sus vías principales de contaminación son manipuladores de alimentos, superficies de contacto y utensilios entre otros. Su patogénesis está centrada en su capacidad de producir biopelículas, adoptando cierta resistencia a agentes antimicrobianos, entre ellos los desinfectantes. Se determinó la acción que ejercen los desinfectantes en cepas de *S.aureus* productoras de biopelículas aisladas de manipuladores de alimentos. Se aislaron 27 cepas de *S. aureus* con capacidad de adherirse y formar biopelículas sobre superficies abióticas como poliestireno y vidrio, aun en presencia de los diferentes desinfectantes ensayados, yodo, hipoclorito de sodio y amonio cuaternario. Se demostró mediante los análisis *estadísticos* que no hubo correlación significativa cuando se compararon con el método Rojo Congo Agar (RCA) y en tubo de ensayos ($r= 0,4589$; $p<0,05$) y entre el método RCA y TPC ($r= 0,2120$; $p> 0,05$). Se evidenció que el yodo fue el desinfectante que tuvo mejor efecto inhibitorio de biopelículas, en comparación con el amonio cuaternario y el hipoclorito de sodio, siendo de gran significancia para la industria de alimentos ya que resulta una alternativa eficaz y efectiva para la sanitización de las manos de los manipuladores de alimentos.

Palabras clave: *Staphylococcus aureus*, manipulación, alimentos, biopelículas, desinfectante

Introducción

El tema de la seguridad alimentaria es hoy una preocupación mundial y una de las metas prioritarias de organismos internacionales y nacionales. El espectro sobre factores de riesgo de enfermedades transmitidas por alimentos indican que la mayoría de los brotes resultan de la manipulación inadecuada de alimentos, producto de las fallas en la aplicación de normas de buenas prácticas y sanitización de manos y superficies. El origen de estas fallas podría estar asociado a que la mayoría de personas que ejercen su labor como manipuladores de alimentos en determinada industria por lo general son personas que carecen del nivel instruccional que les permita entender, mediante capacitaciones continuas, la importancia de llevar a cabo correcta y eficientemente, las normas de buenas prácticas durante su jornada.

Existe una gran variedad de microorganismos patógenos que pueden contaminar los alimentos y causar enfermedades en algunos casos muerte en la población de alto riesgo. Dentro del grupo de microorganismos se encuentran el *Staphylococcus aureus* resulta de importante atención debido a que es un potencial patógeno que forma parte de la flora microbiana normal en individuos sanos. Se encuentra asociado a piel, manos, boca, perineo, vagina o nariz, y su presencia en alimentos usualmente indica contaminación proveniente de los trabajadores que manejan el alimento. Para que un microorganismo en particular inicie su adhesión y posterior producción de biopelículas, sólo necesita un entorno hidratado y una mínima presencia de nutrientes

para desarrollarse, creando la matriz de polisacáridos (biofilm o biopelículas), que les confiere mayor protección frente a los desinfectantes, antibióticos, ambientes hostiles y desecación. Por otra parte, la resistencia a desinfectantes por parte de agentes patógenos de alimentos se ha extendido en los últimos años, entre ellos se encuentra *Staphylococcus* spp. Que representa una potencial amenaza en la inocuidad del alimento. Aunque no se ha señalado cuál es el mecanismo de resistencia, se han encontrado ciertos vínculos genéticos entre resistencia a amonios cuaternarios (QAC) y antibióticos en *Staphylococcus* spp. Asociados a alimentos, lo cual genera una creciente preocupación. Por lo tanto, resulta relevante estudiar la dinámica y los factores que conllevan a patógenos asociados a alimentos como *S. aureus* a expresar su habilidad de producir biopelículas, ya que está los capacita para crecer e invadir alimentos y superficies de contacto asociadas a éstos últimos, dejando comprometida la inocuidad del alimento y provocando la vulnerabilidad de la salud de los consumidores.

Del mismo modo, esta condición de producir biopelículas podría favorecer la resistencia a la acción de los desinfectantes. Es por ello que el presente proyecto de investigación centra su atención a estos eventos, los cuales han sido ampliamente reportados para *S. aureus* en otros países y hasta la fecha, son poco conocidos en nuestro país.

Materiales y Métodos

Las cepas de *S. aureus*, estudiadas en esta investigación, eran procedentes

de una población conformada por manipuladores de alimentos, de ambos sexos, pertenecientes a una empresa del sector productor camarero ubicada en el municipio San Francisco, estado. Zulia, Venezuela.

Se realizaron un total de 4 muestreos en días diferentes, las muestras fueron tomadas luego del lavado de las manos que rutinariamente realizan los manipuladores antes de entrar a la sala de procesamiento del alimento. La toma de muestra se realizó mediante el método de hisopado, haciendo pasar un hisopo estéril por ambas manos del manipulador seleccionado, tomando cuenta la palma y entre dedos. Este hisopo fue colocado en un tubo que contenía agua peptonada al 0,1 % p/v y fueron trasladados en una cajas isotérmicas con hielo, hasta laboratorio de Genética y Biología Molecular de la Facultad Experimental de Ciencias de La Universidad del Zulia. Las muestras fueron sembradas en agar Vogel-Jhonson, selectivo para *Staphylococcus aureus* e incubadas a 35 ± 2 °C por 48 horas, luego se observó si existía crecimiento presuntivo para proceder a realizar las pruebas de tinción diferencial de Gram y de caracterización bioquímica para la confirmación y denominación de la especie estudiada.

Los desinfectantes evaluados sobre los aislados de *S. aureus* fueron: yodo, hipoclorito de sodio, y virex 256, cuyos agentes activos son a base de cloro y amonio cuaternario, respectivamente.

Para determinar la habilidad de producir biopelículas en las cepas de *Staphylococcus* sp se utilizó el Método en placas de Rojo Congo Agar (RCA), siguiendo especificaciones del autor.

Se realizó otro ensayo fenotípico cualitativo para determinar la habilidad de producir biopelículas utilizando el método del tubos de ensayo tiñendo con cristal violeta.

La producción de biopelículas por las cepas de *Staphylococcus aureus* en presencia de detergentes, fue evaluada siguiendo el ensayo del Método sobre Microplacas de cultivos celulares (TCP), modificando el TSB-Glucosado. El cual contenía una concentración de detergente, a la cual todas las cepas estudiadas mostraron sobrevivencia luego de 48 horas de incubación, en la prueba cuantitativa de susceptibilidad a los detergentes.

Los criterios de discriminación y cuantificación del poder adherente y producción de biopelículas en presencia de detergentes, fueron calculados igualmente según ciertas deducciones.

Para la obtención de los genes *icaABC* se realizó la extracción de DNA y posteriormente amplificación en cadena de la polimerasa (PCR). Las reacciones de PCR constaron de un volumen total de 25 µL conteniendo: 2.5 mM MgCl₂; Primers forward y reverse: 0.2 µM; Buffer Taq hasta 1X; mezcla de dNTP's (A, T, C, G): 0,2 mM; 1 µL del DNA extraído y previamente diluido con agua libre de DNasa y RNasa en proporción 1:10 y Taq polimerasa 1,25 U. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador (Applied Biosystems, Modelo PCR 2720) Los ensayos de PCR incluyeron un control interno con primers específicos para amplificar una sección del gen 16S rRNA (16s-PLUS AGGAGGTGATCCAACCGCA y 16s-Minus

AACTGGAGGAAGGTGGGGAT) y del gen *nuc* de *S. aureus* (nucForward AAAGGGCAATACGCAAAGA y nucReverse TAGCCAAGCCTTGACGAACT) a fin de verificar la calidad e identidad del DNA estudiada, respectivamente. Adicionalmente se incluyó como control de reacción, un tubo donde se incluyeron cada uno de los componentes de la PCR sin la inclusión de DNA muestra. Los primeros utilizados para amplificar los genes *icaA*, *icaB* y *icaC* fueron diseñados a partir de la secuencia del operón *ica* publicada en la base de datos del Gen Bank y sintetizados por la compañía Integrated DNA Technologies, Inc., EE.UU, mientras que los primeros, controles, para el gen 16 rRNA y *nuc*. Los datos obtenidos fueron analizados mediante ANOVA a fin de determinar cuáles de las pruebas realizadas para la determinación de la capacidad de producción de biopelículas en las cepas a estudiar, mostraba mejor respuesta luego de la exposición a diferentes desinfectantes. Así mismo, se realizaron correlaciones entre la presencia de los diferentes genes *ica* con la capacidad o no de las cepas para producir biopelículas. Todos los análisis se llevaron a cabo con un nivel de confianza del 95% en el paquete estadístico Statgraphics plus 5.1.

Resultados y Discusión

De un total de 100 muestras aisladas en Agar Vojel jhonson, solo 27% de las cepas resultaron ser *Staphylococcus aureus*, estas fueron caracterizadas mediante pruebas bioquímicas entre las cuales se destacan Coagulasa, DNAsa,

Catalasa y reducción de telurito. La presencia de cepas de *Staphylococcus aureus* en manos de manipuladores de alimentos demuestra que existen fallas en los procesos de higiene y sanitización de los mismos, lo que resulta contraproducente para la inocuidad del producto terminado. Accoa *et al.*, (2003) reportan el aislamiento de un 30% de cepas *S. aureus* resistentes a antimicrobianos aisladas de mucosa nasal de manipuladores de alimentos. Las cepas de *Staphylococcus aureus* estudiadas evidenciaron en su mayoría, la capacidad de producir biopelículas, esto se comprobó al observarse la aparición de colonias negras rugosas sobre las placas de rojo congo agar suplementado con glucosa. También pudieron ser observadas cepas no productoras de biopelículas cuyas colonias eran de color rojo. El 92% de las cepas mostraron la coloración negra y un 8% la coloración roja fenotípica que caracterizan a las cepas de *Staphylococcus aureus* productoras y no productoras de biopelículas respectivamente tal como son descritas por otros autores.

Los resultados obtenidos para la determinación de la capacidad de adhesión y formación de biopelículas sobre superficies abióticas entre las cepas estudiadas revelaron que el 81,48% las cepas de *Staphylococcus aureus* manifestaron habilidades para producir biopelículas sobre la superficie de los tubos de ensayo de vidrio mientras que el 18,5% fueron calificadas como no productoras (Figura 5) La población de cepas ensayadas arrojó los siguientes resultados, las fuertemente productoras mostraron una elevada frecuencia en un

44,4 % mientras que el resto resultaron en un 25, 9% moderadamente productoras, 14,81% débilmente productoras y 18,51% no productoras. Rivera en el 2009, reporta que el 100% las cepas de *Staphylococcus* spp. Provenientes de quesos, manifestaron habilidades sobre la superficie de los tubos de ensayos de vidrio para producir biopelículas. Para la industria de alimentos es importante identificar las condiciones en las que *S. aureus* es capaz de crecer y multiplicarse, ya que el hecho de que estas cepas adquieran mecanismos de adherencia y fijación a superficies de contacto con el alimentos conduce a graves

problemas de higiene, descomposición de los alimentos generando pérdidas económicas para la industria.

Evaluación de la producción de biopelículas por cepas de *Staphylococcus aureus* en presencia de detergentes.

Se demostró que en presencia de agentes desinfectantes la formación de biopelículas y posterior adherencia a superficies de contacto sufren un efecto inhibitorio, sin embargo ciertas cepas mostraron tolerancia a los mismos (Figuras 1 y 2).

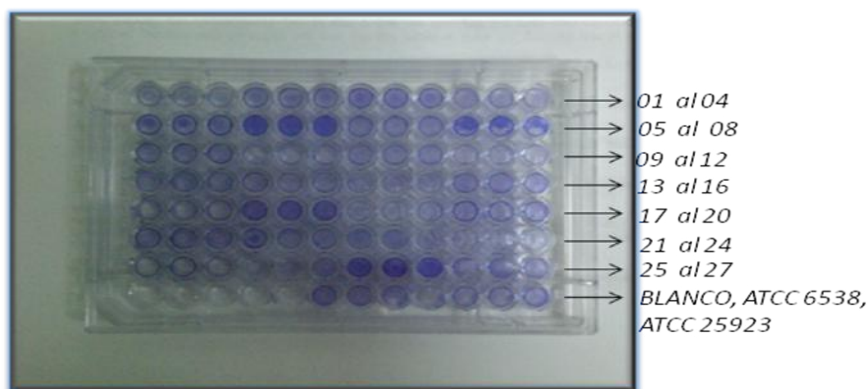


Figura 1. Adhesión y producción de biopelículas en la microplaca de cultivo celular de poliestireno. De izquierda a derecha se observa, por triplicado, cada una de las cepas de *Staphylococcus aureus* ensayadas.

En presencia del hipoclorito a una concentración mínima inhibitoria de 0,75µl/mL el mayor porcentaje se observaron en las cepas no productoras con un 32,0% seguido de las moderadamente productoras 29,6%, las fuertemente productoras con un 25,9%, mientras que los menores porcentajes estuvieron representado por las

débilmente productoras de biopelículas con un 14,9%. También fue ensayado el método TPC en presencia de un agente de tipo amonio cuaternario, cuyo nombre comercial es conocida como VIREX con una concentración de 0,5%, obteniéndose los siguientes valores: 55,5 % las moderadamente productoras, 14,8% fuertemente productoras,

14,8% débiles productoras y 14,8% no productoras. Finalmente cuando fueron sometidas a la presencia del yodo 0,25µL/mL los resultados fueron los

siguientes; 62,9% débiles productoras, 18,51% Moderadamente productoras, 18,51% No productoras y 11, 1% las fuertemente productoras.

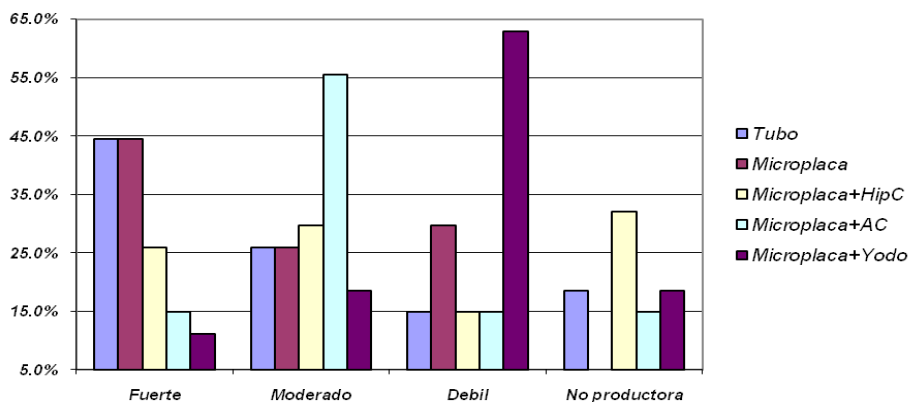


Figura 2. Frecuencia de cepas de *Staphylococcus aureus* productoras de biopelículas en presencia de desinfectantes.

Estos datos evidencian que el yodo fue el que mejor comportamiento presentó en cuanto a efecto antibacterial, en comparación con el amonio cuaternario y el hipoclorito de sodio. Este dato resulta de gran significancia para la industria de alimentos, ya que pudiera resultar una alternativa eficaz y efectiva el uso de yodo para la sanitización de las manos de los operarios o manipuladores de alimentos. Al igual que en este estudio, Mejía *et al.*, (2004) evaluaron la acción de siete desinfectantes utilizados en los criaderos comerciales de pollo frente a cepas de *Staphylococcus aureus* entre ellos amonio cuaternario y yodo, el resto de agentes ensayados fueron compuestos fenólicos y un compuesto de aceite de pino. Resultando que seis de los siete desinfectantes evaluados fueron

efectivos en la muerte de *S. aureus* en el estableciendo que un tiempo de contacto de 10 minutos es suficiente. Un aspecto relevante de esta investigación es que aun cuando la exposición de las cepas de *Staphylococcus aureus* a la acción de desinfectantes redujo la carga bacteriana capaz de producir biopelículas, existe un menor porcentaje que logró resistir a la acción de los mismos y sobrevivir logrando adherirse y formar la biopelícula, lo que pudiera alterar la inocuidad del alimento que se esté procesandose para ejercer la acción bactericida.

En cuanto a la amplificación de los genes *icaABC* los datos obtenidos (Figura 3) indican lo siguiente; para el gen *icaA* solo amplificaron tres cepas bacterianas que representan el 11,1% del total de

muestras, en el caso del gen *icaB* nueve cepas (33,3%) y finalmente el gen *icaC* donde el 100% de las cepas mostraron ausencia del gen. Estos resultados permiten corroborar lo reportado por otros investigadores quienes establecen, que efectivamente los mecanismos que permiten a las cepas de *Staphylococcus aureus* desarrollar biopelículas en superficies de contacto está sujeto en

gran medida a su codificación genética. Por su parte Rivera, (2009) evaluó las características genotípicas en cepas de *Staphylococcus* spp. Observando entre las cepas una elevada frecuencia de aparición de genotipos *icaAB* (44%) y en muy baja proporción la aparición de *Staphylococcus* spp. que carecen de los genes *icaABC*.



IcaB

Figura 3. Productos obtenidos por PCR con primers para gen *icaA* e *icaB* en las cepas *Staphylococcus aureus* aisladas de Manipuladores de alimentos.

Al realizar el análisis estadístico de datos basada en la asociación por grupo promedio (Figura 4) entre las cepas de *Staphylococcus aureus*. Estudiadas, donde se correlacionan sus caracteres fenotípico y genotípico para la adhesión y producción de biopelículas se demuestra que aun cuando las cepas provienen de diferentes manipuladores de alimentos hay un gran porcentaje que guardan similitud entre ellas, mostrando mecanismos homogéneos de adhesión a superficies de contacto y producción de biopelículas. presencia de genes *icaAB*.

La sospecha de mecanismo de adhesión y producción de biopelículas, en los aislados de este estudio, que aparentan ser en su mayoría independientes del

operón *ica* resultan interesantes para ser profundizadas basada ahora en el gen *bap* ya que hoy día se ha observado que éste último gen forma parte de una nueva isla de Patogenicidad descrita en *S. aureus* aislados de mastitis bovina (SaPIbov2) la cual posee cerca del extremo 5' una secuencia de inserción (IS) con un 97% de identidad con el elemento IS257L del transposón Tn4003 y, al igual que en *S. aureus*, en SCoN *bap* está flanqueado por secuencias de inserción implicados en movilidad genética, el hecho de encontrar elementos IS o secuencias procedentes de transposones en las IP es algo habitual y está descrito que presentan una alta inestabilidad, pudiendo ser delecionadas en bloque y sufrir

duplicaciones y amplificaciones. En este apartado, otra fase de variación descrita en *S. aureus* consiste en la obtención de variantes deficientes en la formación del

biofilm debido a la eliminación de la isla de patogenicidad descrita cuando ésta contiene los elementos esenciales para el proceso de formación del biofilm.

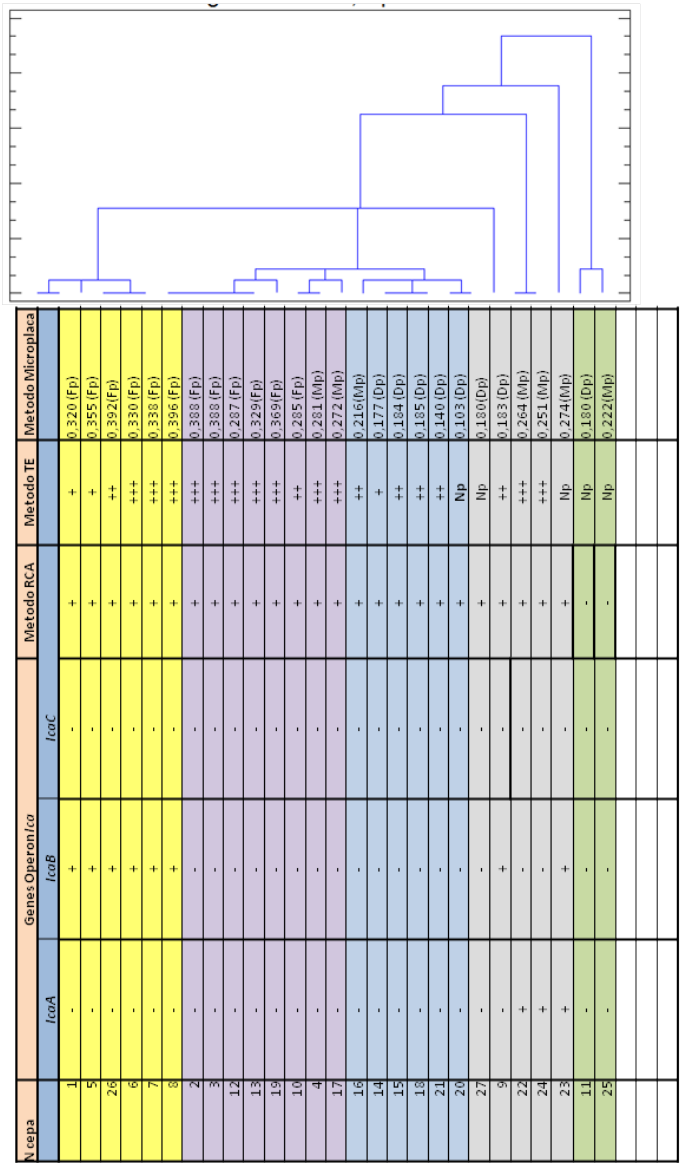


Figura 4. Asociación por grupo promedio entre las cepas de *Staphylococcus* spp. estudiadas, basada en sus caracteres fenotípico y genotípico para la adhesión y producción de biopelículas.

Los resultados obtenidos en esta investigación pueden resultar de gran utilidad a la empresa de alimentos para que tomen conciencia en cuanto a la importancia de los programas preventivos y de sanitización y así mantenerse alerta ante el hecho de que existen cepas patógenas como en este caso de *Staphylococcus aureus* estudiadas las cuales mostraron una potencial capacidad de adhesión a superficies y/o materiales implicando pérdidas económicas en la industria, así como también, posibles pérdidas de vidas humanas en caso de que se lleguen a distribuir dichos alimentos. Es muy importante que la industria tenga presente que superficies tales como: acero inoxidable y vidrio (ésta última aquí ensayada) utilizadas comunmente para el procesamiento de alimentos tienden a ser preferidas por microorganismos para su adhesión y los estudios concuerdan en que éstos sustratos son preferidos por los microorganismos precisamente por contar con alta energía superficial libre que les confiere un carácter hidrofílico por lo cual la adhesión se ve favorecida cuando la energía superficial de la bacteria es aún mayor a la del medio. Es indispensable que la industria de alimento incluya en su lista de prioridad llevar a cabo estrategias que permitan prevenir y controlar posibles contaminaciones cruzadas y así garantizar la inocuidad y calidad del producto terminado. Para esto se deben considerar programas como las Buenas Prácticas de Manufactura y/o sistemas preventivos tales como el HACCP. En el mismo orden de ideas, se debe tomar en consideración que una correcta higiene de los alimentos está

determinada por una serie de factores tales como materia prima, temperaturas y condiciones de conservación, infraestructura de la empresa donde se manipulan los alimentos, entre otros, destacando entre todos ellos la higiene de los manipuladores de alimentos. Si se logra vigilar y controlar cada uno de estos factores así como también entender que la inocuidad debe estar primero que la calidad, las industrias ubicadas en el estado Zulia destinadas al procesamiento de alimentos podrán garantizar la distribución de alimentos seguros al consumo humano y de esta manera podrían alcanzar una excelente posición que la colocaría en una de las preferidas en el mercado nacional e internacional distribuyendo alimentos seguros y de calidad para el consumo humano.

Conclusiones

Se aislaron cepas de *Staphylococcus aureus* productoras de biopelículas capaces de resistir a la acción de los diferentes desinfectantes ensayados de forma variable como: yodo, hipoclorito de sodio y amonio cuaternario.

En presencia de los desinfectantes hipoclorito de sodio, el yodo siendo este el mayor y amonio cuaternario, se observó que un alto porcentaje de cepas fueron incapaces de adherirse y producir biopelículas.

Las cepas aisladas de diferentes manipuladores de alimentos muestran gran similitud en su comportamiento fenotípico sobre las placas de RCA-G y su adhesión a los tubos de ensayos y microplacas de poliestireno.

Respecto a los genotipos, el mayor

porcentaje estuvo representado por la presencia del gen *icaB* seguido del gen *icaA*, siendo toda la proporción carente del gen *icaC*.

Se observó la coexistencia de los genes *icaAB* en las cepas 22,23 y 24. mostrando fenotipos diferentes en los ensayos realizados para comprobar capacidad de adherencia y formación de biopelículas.

Las prácticas del lavado de mano de los manipuladores presentan serias fallas que permiten el crecimiento de cepas de *Staphylococcus aureus* luego de haberlas sanitizados.

Referencias Bibliográficas

Accoa, F.S.; Henriquesa, J.A.P.; Tondo, E.C. (2003). Identification of multiple strains of *Staphylococcus aureus* colonizing nasal mucosa of food handlers. *Food Microbiology*. 20: 489-493.

Arsilan, S.; Ozcarde, F. (2007). Slime production and antibiotic susceptibility in *Staphylococci* isolated from clinical samples. *Memória do Instituto Oswaldo Cruz*. 102:29-33.

Christensen, G.; Simpson, W.; Younger, J.; Baddour, L.; Barrett, F.; Melton, D.; Beachey, E. (1985). Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *Journal Clinical Microbiology*. 22:996-1006.

Figueroa, G.; Navarrete, P.; Caro, M.; Troncoso, M.; Faúndez, G. (2002). Portación de *Staphylococcus aureus* enterotoxigénicos en manipuladores de alimentos. *Revista Médica de Chile*. Versión impresa. ISSN 0034-9887. 130:

859-864.

Freeman, D.; Falkiner, F.; Keane, C. (1989). New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *J. Clinical Pathology*. 42:872-874.

González, J.A.; Rego, C. S.; Gallardo, F.J.; García, L.; Rodríguez, A. (2003). Efectividad de diferentes desinfectantes de uso alimentario frente a microorganismos aislados de una industria alimentaria. *Alimentaria: Revista de tecnología e higiene de los alimentos*. 341:49-52.

Greisen, K.; Loeffelholz, M.; Purohit, A.; Leong, D. (1994). PCR primers and probes for the 16S rRNA gene of most species of pathogenic bacteria, including bacteria found in cerebrospinal fluid. *J. Clinical Microbiology*. 32:335-351.

Hacker, J.; Blum-Oehler, G.; Mulhodorfer, I.; Tschape, H. (1997). Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Mol. Microbiol*. 23:1089-109. Hacker, J.; Kaper, J. (2000). Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu. Revista Microbiologia*. 54:64-679.

López, L.; Romero, J.; Ureta, F. (2002). Acción germicida in vitro de productos desinfectantes de uso en la industria de alimentos. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 52(1).

Lues, J.F.R.; Tonder, I. (2007). The occurrence of indicator bacteria on hands and aprons of food handlers in the delicatessen sections of a retail group. *Food Control*. 18: 326-332.

Mac Faddin, J. (2000). Biochemical test for identification of medical bacteria. chapter 19. Third Edition. United States of

- America. Editorial Lawrence Mc Grew. Pp 254;272.
- Manijeh, M.; Mohammad, J., Kermanshashi, K. (2008). The assessment of biofilm formation in Iranian meat processing environments. *Res. Journal Micobiology*. 3:181-186
- Mejia, A; Morishita, T.Y.; Lam, K.M. (2004). The effects of seven chicken hatchery disinfectants on a *Staphylococcus aureus* strain. *Preventive Veterinary Medicine*.18:193-201
- Ramesh, A.; Padmapriya, B.; Varadaraj, A. (2002). Application of a convenient DNA extraction method and multiplex PCR for the direct detection of *Staphylococcus aureus* and *Yersinia enterocolitica* in Milk samples. *Molecular and celular probes*. 16:307-314.
- Rivera, J. (2009). Caracterización fenotípica y genotípica de cepas de *Staphylococcus* sp. productoras de biofilm aisladas de quesos. Trabajo Especial de Grado. Facultad Experimental de Ciencias de la Universidad del Zulia. 80 pp.
- Rodríguez, J.; Hernández, M. (2007). Importancia del control higiénico de superficies alimentarias mediante técnicas rápidas y tradicionales para evitar y/o minimizar la contaminación cruzada. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona, España. 150 pp.
- Tauxe, R. (2002). Emerging Foodborne pathogens. *Internl. J. Food Microbiol*. 78: 31-41.
- Ubeda, C.; Tormo, M.A.; Cucarella, C.; Trotonda, P.; Foster, T.J.; Lasa, I.; Penades, J.R. (2003). Sip, an integrase protein with excision, circularization and integration activities, defines a new family of mobile *Staphylococcus aureus* pathogenicity islands. *Mol. Microbiol*. 49: 193-210.
- Yazdani, R.; Oshagi, M.; Havayi, A.; Pishva, E.; Salehi, R.; Sadeghizadeh, M.; Forooresh, H. (2006). Detection of *icaAD* gene and biofilm formation in *Staphylococcus aureus* isolates from wound infections. *Iranian J. Publ. Health*. 35:25-28.