



RESEARCH ARTICLE

Lactobacillus acidophilus ve *Lactobacillus casei*'nin, Metisilin dirençli ve metisilin duyarlı *Staphylococcus aureus* biyofilm genlerine in-vitro etkisinin incelenmesi

Hikmet Dinç^{1*a}, Mehmet Demirci^{2,b}, Akın Yiğın^{3,c}

¹Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, Şanlıurfa, Türkiye

²Beykent Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul Türkiye

³Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Genetik Anabilim Dalı, Şanlıurfa, Türkiye

Geliş:06.09.2018, Kabul: 11.01.2019

*hikmetdnc@gmail.com

^aORCID: 0000-0003-1823-1790, ^bORCID: 0000-0001-9670-2426, ^cORCID:0000-0001-9758-1697

Investigation of the in-vitro effect of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* on biofilm genes of methicillin-resistant and methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*

Eurasian J Vet Sci, 2019, 35, 1, 44-48

DOI: 10.15312/EurasianJVetSci.2019.221

Öz

Amaç: *Staphylococcus aureus*'un *icaA* ve *icaR* genleri üzerinden düzenlediği biyofilm yeteneği, oluşturdukları enfeksiyonlar ile mücadeleyi zorlaştırmaktadır. Bu çalışmada, *Lactobacillus acidophilus* ve *Lactobacillus casei*'nin, metisilin duyarlı (MSSA) ve metisilin dirençli (MRSA) *S. aureus* suşlarının *icaA* ve *icaR* gen ekspresyonlarına etkisinin in-vitro olarak incelenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: *icaA* ve *icaR* gen ekspresyonlarının kontrolü için 6 tüp hazırlandı. 37°C'da %5 CO₂'li ortamda inkübe edildi. İnkübasyonun 6., 12., ve 24. saatinde RNA izolasyonları yapıldı. cDNA sentezi sonrasında, *icaA*, *icaR* ve 16SrRNA genlerine spesifik primerler ile real-time PCR'la çalışıldı. Delta delta Ct yöntemine göre sonuçlar analiz edildi.

Bulgular: *S. aureus* ATCC 43300 (MRSA) ve *S. aureus* ATCC 29213 (MSSA) *icaA* gen ve *icaR* ekspresyonları, *L. acidophilus* ve *L. casei* ile karşılaşma sonrası sırasıyla down regülasyon ve upregülasyon göstermiştir. 12. saat ve 24. saatte saptanan *icaA* ve *icaR* gen ekspresyon seviyelerinin hem MRSA hem de MSSA suşlarında benzer olduğu gözlenmiştir.

Öneri: Sonuç olarak, çalışmamız, probiyotik etkili *L. acidophilus* ve *L. casei* suşlarının *S. aureus* suşlarının biyofilm etkinliklerini *icaA* ve *icaR* gen ekspresyonlarını real-time PCR yöntemi ile araştıran ilk çalışmadır. *L. acidophilus* ve *L. casei*'nin in-vitro ortamda MRSA ve MSSA suşlarını etkileyerek *icaA* ve *icaR* gen ekspresyonlarını değiştirebildikleri saptanmıştır. Probiyotik etkili bu suşların antibiyofilm özelliklerinin *S. aureus* enfeksiyonlarına karşı yeni bir mücadele seçeneği olabileceği düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: *S. aureus*, biyofilm, Real-time PCR, probiyotik

Abstract

Aim: *Staphylococcus aureus*'s biofilm ability which control via *icaA* and *icaR* gene is a serious problem in the treatment of infections. Aim of this study was to investigate in-vitro effects of important probiotic *L. acidophilus* and *L. casei* on the *icaA* and *icaR* genes expressions of the MRSA and MSSA strains.

Materials and Methods: In this study, to determine the *icaA* and *icaR* gene expressions, 6 tubes in probiotics were prepared. Incubated at 37°C in 5% CO₂ medium. RNA isolations were performed at the 6th, 12th, and 24th hours of incubation. After cDNA synthesis, real-time PCR with primers specific for *icaA*, *icaR* and 16S rRNA genes were studied. The results were calculated with delta delta Ct method.

Results: *S. aureus* ATCC 43300 (MRSA) and *S. aureus* ATCC 29213 (MSSA) *icaA* gene and *icaR* gene expressions showed down regulation and upregulation respectively after encountering *L. acidophilus* and *L. casei*. The *icaA* and *icaR* gene expression ratios determined at 12 hours and 24 hours were found to be similar in both MRSA and MSSA strains.

Conclusion: This study was the first study to investigate effect of *L. acidophilus* and *L. casei* strains on biofilm gene expression of the *S. aureus* strains by the real-time PCR method. It was determined that *L. acidophilus* and *L. casei* were able to alter *icaA* and *icaR* gene expression by affecting the MRSA and MSSA strains in-vitro. We believe that the antibiotic properties of these probiotic strains may be a new treatment option against *S. aureus* biofilm infections.

Keywords: *S. aureus*, biofilm, Real-time PCR, probiotic

Giriş

Gram pozitif *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), hem insanların özellikle burun delikleri ve derisi florasında bulunan komensal bir bakteri, hem de yüzeysel cilt ve yumuşak doku enfeksiyonları ile bakteriyemi, pnömoni, endokardit ve osteomyelit gibi hayatı tehdit eden invaziv hastalıklara neden olabilen zorlu bir fırsatçı patojen olarak kabul edilmektedir (Nicholson ve ark 2013, Crosby ve ark 2016). Çoğu *S. aureus* enfeksiyonuna, penisilinle tedavi edilebilen metisilin duyarlı *S. aureus* (MSSA) neden olur (Loewen ve ark 2017). Metisilin dirençli *S. aureus* (MRSA), 1961 yılında, semisentetik penisilin olan metisilin, kullanıma girdikten kısa bir süre sonra bildirilmiştir (Orlin ve ark 2017). Metisilin direnci genellikle, metisilin ve tüm beta-laktam antibiyotiklere karşı afinitesi azalmış bir 78-kD penisilin bağlanma proteini (PBP2a) kodlayan stafilkoksik kaset kromozomu mec (SCCmec) üzerinde taşınan mecA genine bağlıdır (Abdulgader ve ark 2015).

Cerrahi alan enfeksiyonları (SSI) en yaygın ameliyat sonrası komplikasyonlardan birisidir ve sağlıkla ilişkili enfeksiyonların yaklaşık 30'unu oluşturur (Savage ve Anderson 2013). Cerrahi alanlarda oluşan *S. aureus* enfeksiyonlarına neden olan suşların yaklaşık %80'inin *S. aureus* izolatları ile ilgili hastaların burunlarında saptanan suşların moleküler özdeşliğe sahip olduğu tespit edilmiştir (Perl ve ark 2002). Özellikle kalp cerrahisi ve ortopedik cerrahi de *S. aureus* enfeksiyonları yaygındır ve bu bakterinin özellikle implantlar gibi tıbbi cihazlara biyofilm yeteneği burada oluşan enfeksiyonlar ile mücadelede ciddi sorunun oluşturmaktadır (Sakr ve ark 2018). *S. aureus* biyofilm üretimi, çoğunlukla β -1, 6-N-asetilglukosamin kalıntılarında oluşan, polisakkarit hücreler arası adhezin (PIA) salgılanması ile başlar. PIA üretimi ve atılımı icaADBC operonu tarafından kontrol edilir. icaADBC operonunda, IcaA, ilk transkript edilen genidir ve kısa zincirli N-asetil glukozamin oligomerlerinin üretilmesine sağlar. IcaA DBC lokusu, icaR geni tarafından yönetilen bir transkripsiyon baskılayıcı protein tarafından düzenlenir. Bu represör protein, icaA başlangıç kodonuna yakın ica operon promoter bölgesine bağlanabilir ve icaADBC ifadesini negatif olarak düzenler (Cue ve ark 2009, Melo ve ark 2016). Sonuçta, *S. aureus* tarafından biyofilm oluşumu, katı yüzeyler üzerinde bakterilerin birikmesine yol açan, bakteriyel yapışmaya aracılık eden polisakkarit hücreler arası adhezin (PIA) olarak da adlandırılan poli N-asetilglukozamin (PNAG) üretimi ile ilişkilidir (Lin ve ark 2016).

Probiyotikler, "Gıdalarda uygun miktarlarda tüketildiklerinde, kontakta sağlık yararı sağlayan canlı mikroorganizmalar" olarak tanımlanırlar (Liévin-Le Moalve Servin 2014). Laktik asit bakterileri (LAB) olan *Lactobacillus spp.* gibi probiyotik olarak önemli mikro organizmalardır. Yakın zamanda sağlığa yararlı özellikleri nedeniyle ciddi önem kazanmışlardır (Tiptiri-Kourpeti ve ark 2016). *Lactobacillus acidophilus* ve *Lactobacillus casei* insan bağırsağından izole edilen, ticari

olarak önemli probiyotikler olarak bilinmektedir (Moller ve ark 2012, Tiptiri-Kourpeti ve ark 2016).

Bu çalışmada, tüm bu bilgiler ışığında, probiyotik etkili *L. acidophilus* ATCC 4356 ve *L. casei* ATCC 393'ün, MRSA ve MSSA suşlarının biyofilm yeteneklerini sağlayan icaA ve icaR gen ekspresyonlarına etkisinin in-vitro olarak incelenmesi ve *S. aureus* biyofilm enfeksiyonlarına karşı kullanılabilir yeni mücadele stratejilerinin geliştirilebilmesi için veri sunulması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Kullanılan mikroorganizma suşları

Bu çalışmada *L. acidophilus* ATCC 4356, *L. casei* ATCC 393, *S. aureus* ATCC 43300 (MRSA) ve *S. aureus* ATCC 29213 (MSSA) suşları kullanıldı. *Lactobacillus* suşlarında Man, Rogosa, ve Sharpe (MRS) agarda (Oxoid, UK) ve *S. aureus* suşları %5 koyun kanlı agar (Oxoid, UK) içerisinde 37°C'da %5 CO₂'li ortamda 48 saat inkübe edildi.

İnkübasyon ve besiyerlerinde mikroorganizmaların üretimi

İnkübasyonun ardından, *S. aureus* ATCC 43300 (MRSA), kanlı agar besi yerinden alınan kolonilerinden, steril tuzlu su (saline) içinde hazırlanan 2 McFarland'lık süspansiyonundan 250'er μ L alınarak, 3 farklı triptik soy broth (TSB) içeren tüpe eklendi. 1. tüpte 106 CFU/mL miktarında *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, 2. tüpte 106 CFU/mL miktarında *Lactobacillus casei* ATCC 393 bulunurken, 3. tüp kontrol amaçlıydı. Her 3 tüpe'de %5 CO₂'li ortamda 37°C'da inkübe edildi. aynı şekilde *S. aureus* ATCC 29213 (MSSA), kanlı agar besi yerinden alınan kolonilerinden, steril tuzlu su (saline) içinde hazırlanan 2 McFarland'lık süspansiyonundan 250'er μ L alınarak, 3 farklı triptik soy broth (TSB) içeren tüpe eklendi. MRSA'dakine benzer şekilde 1. tüpte 106 CFU/mL miktarında *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, 2. tüpte 106 CFU/mL miktarında *Lactobacillus casei* ATCC 393 bulunurken, 3. tüp kontrol amaçlıydı. MRSA ve MSSA suşlarını içeren bu 6 tüp %5 CO₂'li ortamda 37°C'da inkübe edildi. İnkübasyonun 6., 12., 24. saatlerinde, besi yerlerinden RNA izolasyonları için numune alındı ve bu numunelerden High Pure RNA izolasyon kiti (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Almanya) kullanılarak üretici direktifleri doğrultusunda RNA izolasyonları gerçekleştirildi. RNA'ların Nanodrop (ThermoScientific, USA) spektrofotometre cihazında konsantrasyonları ve saflıkları ölçüldü. Real-time PCR işlemlerine kadar -80°C'da saklandı.

Real-Time PCR ile analizi

RNA'ların konsantrasyonları 100 ng/ μ L olacak şekilde işleme alındı ve First Strand cDNA synthesis kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Almanya) kullanılarak üretici di-

Tablo 1. Real-time PCR'la *icaA*, *icaRve* 16S rRNA genlerini saptamak için kullanılan primerler

Primer Adı	Oligonukleotid	Kaynak
<i>icaA F</i>	5'-TTTCGGGTGTCTTCACTCTAT-3'	
<i>icaA R</i>	5'-CGTAGTAATACTTCGTGTCCC-3'	
<i>icaR F</i>	5'-ATCTAATACGCCTGAGGA-3'	
<i>icar R</i>	5'-TTCTTCCACTGCTCCAA-3'	Melo ve ark, 2016
16S rRNA F	5'-CGTGGAGGGTCATTGGA-3'	
16S rRNA R	5'-CGTTTACGGCGTGGACT-3'	

Tablo 2. MRSA ve MSSA *icaA* ve *icaR* gen ekspresyonlarına *L. casei* ve *L. acidophilus*'un etkisinin saatlere göre dağılımı (ortalama değer + standart sapma)

<i>S. aureus</i> ATCC 43300 (MRSA)	<i>icaA</i> *			<i>icaR</i> *		
	6 saat	12 saat	24 saat	6 saat	12 saat	24 saat
<i>L. casei</i> ATCC 393	0.64+0.02	0.59+0.03	0.58+0.03	0.61+0.02	0.78+0.05	0.8+0.02
<i>L. acidophilus</i> ATCC 4356	0.69+0.02	0.65+0.04	0.64+0.03	0.72+0.04	0.9+0.04	0.92+0.03
Kontrol	0.75+0.06	0.88+0.03	0.89+0.02	0.18+0.02	0.15+0.03	0.15+0.03
<i>S. aureus</i> ATCC 29213 (MSSA)	<i>icaA</i>			<i>icaR</i>		
	6 saat	12 saat	24 saat	6 saat	12 saat	24 saat
<i>L. casei</i> ATCC 393	0.71+0.02	0.61+0.03	0.60+0.02	0.48+0.02	0.62+0.01	0.63+0.02
<i>L. acidophilus</i> ATCC 4356	0.70+0.04	0.61+0.04	0.62+0.03	0.70+0.01	0.77+0.03	0.79+0.03
Kontrol	0.68+0.03	0.82+0.01	0.88+0.02	0.19+0.02	0.17+0.01	0.15+0.02

*rölatif gen ekspresyon oranları

rektifleri doğrultusunda komplementer DNA'lar (cDNA) oluşturuldu. cDNA'lar kullanılarak Tablo 1'de belirtilen primerler ve LightCycler 480 SybrGreen I master kiti kullanılarak LightCycler 480 sisteminde (RocheDiagnostics, Mannheim, Almanya) üretici direktifleri doğrultusunda *icaA*, *icaR* ve 16S rRNA genleri için çalışma gerçekleştirildi (Melo ve ark, 2016). *S. aureus*'un 16S rRNA geni çalışmada referans gen olarak kullanıldı. Real-time PCR çalışmaları üç kez tekrarlandı. Livak'ın delta delta Ct yöntemine göre gen ekspresyon oranları çıkartıldı (Livak ve Schmittgen 2001).

Bulgular

Çalışmamız sonucunda, elde edilen veriler Tablo 2'de gösterilmiştir. *S. aureus* ATCC 43300 (MRSA) ve *S. aureus* ATCC 29213 (MSSA) *icaA* gen ekspresyonları, *L. acidophilus* ve *L. casei* ile karşılaşma sonrası down regülasyon göstermişken, *icaR* gen ekspresyonlarının, *L. acidophilus* ve *L. casei* ile karşılaşma sonrası upregülasyon gösterdiği saptanmıştır. *L. acidophilus*'un, *icaR* gen ekspresyonunu *L. casei*'ye göre biraz daha fazla oranda upregüle ettiği görülürken, *L. casei*'nin *icaA* gen ekspresyonunu *L. acidophilus*'a göre daha çok downregüle ettiği görülmektedir. MRSA suşlarının *icaA* ve *icaR* gen ekspresyonu değişimlerinin MSSA suşlarına göre biraz daha fazla olduğu saptanmıştır. 12. saat ve 24. saatte saptanan *icaA* ve *icaR* gen ekspresyon seviyelerinin hem

MRSA hem de MSSA suşlarına benzer olduğu ve suşların 12. saatlerinde besiyerine biyofilm yeteneği açısından adapte olduğu gözlenmiştir.

Tartışma

Son yıllarda yapılan bazı çalışmalar, probiyotiklerin *S. aureus* gibi patojenlere olan etkilerinin anlaşılmasını sağlamış ve bu etkinin *S. aureus*'un biyofilm yeteneğini kaybetmesine yol açabileceğini göstermektedir (Eggersve ark 2018). Cue ve ark (2016) Endokardit ve osteomyelit gibi bazı ciddi *S. aureus* enfeksiyonlarının biyofilm oluşumu ile ilişkili olduğunu Mashruwala ve ark (2017) ise yaptıkları çalışmada *S. aureus*'un biyofilm yeteneğini etkileyebilmesinin sağlanmasının bu bakteriyel enfeksiyonlar ile yeni bir mücadele yöntemlerini ortaya koyulabileceğini bildirmişlerdir.

Bu çalışmadaki gibi *L. casei* ve *L. acidophilus* kullanılarak, MRSA ve MSSA suşları ile ilgili yapılmış benzer çalışmalara literatür taramasında tespit edilemedi. Fakat aynı suşlar veya benzer inhibitör ürünlerle yapılmamış olmasına karşın benzer yönde olduğu saptanan bazı araştırmalar incelendiğinde; Nguyen ve ark (2016), *S. aureus* suşlarının *L. acidophilus* suşları ile biyofilm etkinliğini araştırmışlar ve biyofilm etkinliğinin *L. acidophilus* uygulaması sonrası azaldığını bildirmişlerdir. Stefania ve ark (2017), *L. acidophilus* ve *L. casei*'nin



S. aureus biyofilm etkisini azalttığını bildirmişlerdir. Melo ve ark (2016), Brezilya'da, *Lactobacillus fermentum*'un, mevcut çalışmaya benzer şekilde *S. aureus* biyofilm oluşumuna negatif etki gösterdiğini, *icaR*'nin uygulama sonrasında upregule olduğunu, *icaA*'nın ise downregule olduğunu bildirmişlerdir. Gen ekspresyon oranları bizim çalışmamıza yakın olmasına karşın, bizim çalışmamızda da fark ettiğimiz şekilde farklı probiyotiklerin farklı düzeyde etkilerinin olabileceğini bize düşündürmüştür. Nuryastuti ve ark (2009), yaptıkları çalışmalarında, Tarçın yağının antimikrobiyal etkisinin olduğunu ve bunun ayrıca *Staphylococcus epidermidis* *icaA* gen ekspresyonunun, bizim çalışmamıza benzer şekilde downreguleye neden olduğunu bildirmişlerdir. Kashefi ve ark (2017), yaptıkları çalışmada, K vitamini uygulanması sonrası MRSA suşlarının *icaA* ve *icaR* gen ekspresyonlarının upregule olduğunu bildirmiştir. Normal durumda *icaR*'nin *icaA*'nın çalışmasını baskılaması gerektiği bilinmektedir. Bu veri bizim çalışmamıza göre ters görülmektedir. Fakat Conlon ve ark (2002) yılında yaptıkları çalışmada bildirdikleri gibi bazen *Staphylococcus* suşları *icaR* bağımsız şekilde *icaA* DBC operonunu çalıştırabilmektedir. Kashefi ve ark (2017)'nin yaptıkları çalışmada *icaR*'nin yükselmesine karşın, *icaA* gen ekspresyonunda yükseliyor olmasının nedeni bu olabilir. Shrestha ve ark (2016), yaptıkları çalışmada, "antibiyofilm compound 1" (ABC-1) isimli ufak bir molekülü *S. aureus* suşlarının *icaA* ve *icaR* gen ekspresyonlarının etkisini denemişler ama bu molekülün *icaA* veya *icaR* gen ekspresyonlarını etkilemediğini görmüşlerdir.

Öneriler

Bu çalışma, probiyotik etkili *L. acidophilus* ve *L. casei* suşlarının *S. aureus* suşlarının biyofilm etkinliklerini *icaA* ve *icaR* gen ekspresyonlarını real-time PCR yöntemi ile araştıran ilk çalışmadır. *L. acidophilus* ve *L. casei*'nin in-vitro ortamda MRSA ve MSSA suşlarını etkileyerek *icaA* ve *icaR* gen ekspresyonlarını değiştirebildiklerini göstermiştir. MRSA ve MSSA suşlarına etkisi açısından fark saptanmamıştır. Biyofilm oluşturma yeteneği dolayısıyla özellikle implantlar gibi medikal cihazlarla oluşan enfeksiyonlarda çok etkili olan *S. aureus* ile yeni bir mücadele seçeneği olabileceği kanaatindeyiz.

Kaynaklar

Abdulgader SM, Shittu AO, Nicol MP, Kaba M, 2015. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Africa: a systematic review. *Front Microbiol*, 6, 348.

Conlon KM, Humphreys H, O'Gara JP, 2002. Regulation of *icaR* gene expression in *Staphylococcus epidermidis*. *FEMS Microbiol Lett*, 216(2), 171-177.

Crosby HA, Kwiecinski J, Horswill AR, 2016. *Staphylococcus aureus* aggregation and coagulation mechanisms, and their function in host-pathogen interactions. *Adv Appl Microbi-*

ol, 96, 1-41.

- Cue D, Lei MG, Luong TT, Kuechenmeister L, Dunman PM, O'Donnell S, Lee CY, 2009. Rbf promotes biofilm formation by *Staphylococcus aureus* via repression of *icaR*, a negative regulator of *icaADBC*. *J Bacteriol*, 191, 6363-6373.
- Eggers S, Barker AK, Valentine S, Hess T, Duster M, Safdar N, 2018. Effect of *Lactobacillus rhamnosus* HN001 on carriage of *Staphylococcus aureus*: results of the impact of probiotics for reducing infections in veterans study. *BMC Infect Dis*, 18, 129.
- Kashefi pasandideh N, Habibi MR, Tahmasebi H, Arabestani MR, 2018. Activity of biofilm genes *icaA* and *icaR* in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* treated with vitamin K in wound specimens. *Koomesh*, 20, 588-593.
- Liévin-Le Moal V, Servin AL, 2014. Anti-infective activities of *Lactobacillus* strains in the human intestinal microbiota: from probiotics to gastrointestinal anti-infectious biotherapeutic agents. *Clin Microbiol Rev*, 27, 167-199.
- Lin MH, Shu JC, Lin LP, Yu Chong K, Cheng YW, Du JF, Liu, ST, 2015. Elucidating the crucial role of poly N-acetylglucosamine from *Staphylococcus aureus* in cellular adhesion and pathogenesis. *PLoS One*, 10(4), 1-13.
- Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25(4), 402-408.
- Loewen K, Schreiber Y, Kirlew M, Bocking N, Kelly L, 2017. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection: Literature review and clinical update. *Can Fam Physician*, 63, 512-520.
- Mashruwala AA, Guchte AV, Boyd JM, 2017. Impaired respiration elicits SrrAB-dependent programmed cell lysis and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Elife*, 6, 23845.
- Melo TA, Dos Santos TF, de Almeida ME, Junior LAGEF, Andrade EF, Rezende RP, Romano C C, 2016. Inhibition of *Staphylococcus aureus* biofilm by *Lactobacillus* isolated from fine cocoa. *BMC Microbiol*, 16(1), 250.
- Möller MS, Fredslund F, Majumder A, Nakai H, Poulsen JCN, Leggio LL, Hachem MA, 2012. Enzymology and structure of the GH13_31 glucan 1,6- α -glucosidase that confers isomaltooligosaccharide utilization in the probiotic *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *J Bacteriol*. 2012, 194(16), 4249-4259.
- Nguyen D, Huynh T, Nguyen T, 2016. Anti-biofilm activities of *Lactobacillus acidophilus* against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. *J Chem Pharm Res*, 8, 464-467.
- Nicholson TL, Shore SM, Smith TC, Frana TS, 2013. Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (LA-MRSA) isolates of swine origin form robust biofilms. *PLoS One*, 8(8),
- Nuryastuti T, Van der Mei HC, Busscher HJ, Irvati S, Aman AT, Krom BP, 2009. Effect of cinnamon oil on *icaA* expression and biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis*. *Appl Environ Microbiol*, 75, 6850-6855.
- Orlin I, Rokney A, Onn A, Glikman D, Peretz A, 2017. Hospital clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* are carried by medical students even before healthcare exposure. *Antimicrob Resist Infect Control*, 6, 15.
- Perl TM, Cullen JJ, Wenzel RP, Zimmerman MB, Pfaller MA,



- Sheppard D, 2002. Intranasal mupirocin to prevent postoperative *Staphylococcus aureus* infections. N Engl J Med, 346, 1871-1877.
- Sakr A, Brégeon F, Mège JL, Rolain JM, Blin O, 2018. *Staphylococcus aureus* nasal colonization: an update on mechanisms, epidemiology, risk factors, and subsequent infections. Front Microbiol, 9, 2419.
- Savage JW, Anderson PA, 2013. An update on modifiable factors to reduce the risk of surgical site infections. Spine J, 13, 1017-1029.
- Shrestha L, Kayama S, Sasaki M, et al, 2016. Inhibitory effects of antibiofilm compound against *Staphylococcus aureus* biofilms. Microbiol Immunol, 60, 148-59.
- Stefania DM, Miranda P, Diana M, Claudia Z, Rita P, 2017. Antibiofilm and antiadhesive activities of different synbiotics. J Prob Health, 5 (182), 2.
- Tiptiri-Kourpeti A, Spyridopoulou K, Santarmaki V, Aindelis G, Tompoulidou E, Lamprianidou E E, Kotsianidis I, 2016. *Lactobacillus casei* exerts anti-proliferative effects accompanied by apoptotic cell death and up-regulation of trail in Colon Carcinoma Cells. PLoS One, 11(2).