

# The frequency of *mecA* and *icaA/icaD* genes in staphylococci isolated from the ear canal of swimmers

## Frequenza dei geni *mecA* e *icaA/icaD* negli stafilococchi isolati dal condotto uditivo di nuotatori

Yunus YILDIRIM <sup>1</sup>, Nizami DURAN <sup>2\*</sup>, Gulay G. DURAN<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Physical Education and Sport High School, Mustafa Kemal University, Hatay, Turkey; <sup>2</sup>Department of Medical Microbiology, Faculty of Medicine, Mustafa Kemal University, Hatay, Turkey; <sup>3</sup>Department of Medical Biology and Genetics, Faculty of Medicine, Mustafa Kemal University, Hatay, Turkey

\*Corresponding author: Nizami Duran, Mustafa Kemal University, Department of Medical Microbiology, Faculty of Medicine, Mustafa Kemal University, Hatay, Turkey. E-mail: nizamduran@hotmail.com

### SUMMARY

**BACKGROUND:** *Staphylococci* are the primary causes of external and internal auditory canal infections among other bacterial agents. The ability of disease in staphylococci depend on various virulence factors. The aim of this study was to investigate the frequency of *mecA* genes and slime production in staphylococci isolated from the external auditory canal of the student attending the swimming course.

**METHODS:** This study is a controlled laboratory study. A total of 263 swimming students and 98 voluntaries were included to the study. Cultures were taken from the swimming students' and healthy persons' external ear canal. Methicillin resistance gene (*mecA*), slime genes and biofilm production in *staphylococci* were determined by genotypic and phenotypic methods.

**RESULTS:** *MecA* was positive in 14.4% of all isolates. Whilst the presence of *mecA* gene in a total of 59 strains of *S. aureus* was found to be 8.5% in swimmers, this ratio was detected as 16.2% among the coagulase-negative staphylococci (CNS). The presence of the *mecA* gene among CNS was significantly higher than that of *S. aureus* isolates ( $P<0.001$ ). In 206 strains of 263 (78.3%) *staphylococci*, the presence of *icaA* and *icaD* genes was detected as 78.3% in *staphylococci* among swimmers. This ratio in *S. aureus* and CNS was 59.3% and 83.8%, respectively. Slime genes in the control group was detected as 63.3%, whereas this rate was statistically significant higher in swimmers ( $P<0.001$ ). The frequency rates of *icaA* and *icaD* genes among *S. aureus* and CNS in healthy control group were 53.3% and 65.1%, respectively ( $P<0.05$ ).

**CONCLUSIONS:** The rate of methicillin resistance and slime production in *staphylococci* and also, the colonization rate of *S. aureus* within ear canal in the students attending swimming course was found higher than in the healthy volunteers. To prevent outbreaks of swimming pool-associated illness, periodically, athletes should be screened for pathogenic microorganisms such as slime-producing and methicillin resistant *staphylococci*.

(Cite this article as: Yildirim Y, Duran N, Duran GG. The frequency of *mecA* and *icaA/icaD* genes in staphylococci isolated from the ear canal of swimmers. Med Sport 2016;69:58-70)

**KEY WORDS:** Swimmer - *Staphylococcus aureus* - Genes.

### RIASSUNTO

**OBBIETTIVO:** Tra i batteri, gli stafilococchi sono la causa primaria delle infezioni al condotto uditivo esterno e interno. La capacità degli stafilococchi di causare una malattia dipende da vari fattori di virulenza. L'obiettivo del presente studio è stato quello di indagare sulla frequenza dei geni *mecA* e sulla produzione di glicocalice negli stafilococchi isolati dal condotto uditivo esterno di studenti partecipanti a un corso di nuoto.

**METODI:** Il presente studio è uno studio di laboratorio controllato. Un totale di 263 studenti nuotatori e di 98 volontari hanno preso parte allo studio. Sono state prelevate delle colture dal condotto uditivo esterno dei nuotatori e delle persone sane. Il gene per la resistenza alla meticillina (*mecA*), i geni per il glicocalice e la produzione di biofilm negli stafilococchi sono stati determinati tramite metodi di genotipizzazione e fenotipizzazione.

**RISULTATI:** Il *mecA* è risultato positivo nel 14,4% di tutti gli isolati. Mentre la presenza del gene *mecA* è stata riscontrata nell'8,5% di un totale di 59 ceppi di *S. aureus* nei nuotatori, tale rapporto è risultato essere del 16,2% negli stafilococchi coagulasi negativi (CNS, coagulase-negative staphylococci). La presenza del gene *mecA* tra i CNS è risultata significativamente maggiore che tra gli isolati di *S. aureus* ( $P < 0,001$ ). In 206 ceppi su 263 (78,3%) stafilococchi, la presenza dei geni *icaA* e *icaD* è stata riscontrata nel 78,3% degli stafilococchi tra i nuotatori. Tale rapporto è risultato essere rispettivamente del 59,3% e dell'83,8% nello *S. aureus* e nei CNS. I geni per il glicocalice nel gruppo di controllo sano è risultata rispettivamente del 53,3% e del 65,1% ( $P < 0,05$ ).

**CONCLUSIONI:** I tassi di resistenza alla meticillina e di produzione di glicocalice negli stafilococchi e i tassi di colonizzazione di *S. aureus* nel condotto uditivo riscontrati negli studenti che frequentavano il corso di nuoto sono risultati più elevati che tra i volontari sani. Al fine di prevenire epidemie di malattie associate alla piscina, gli atleti devono essere esaminati periodicamente per i microrganismi patogeni, come gli stafilococchi produttori di glicocalice e gli stafilococchi resistenti alla meticillina.

**PAROLE CHIAVE:** Nuotatori - *Staphylococcus aureus* - Geni

Otitis externa is the most common ear infection type in otolaryngology. Staphylococci are the most important causes of external ear canal infections. Swimming is reported to be one of the most major risk factors for external otitis.<sup>1</sup> Staphylococci are the primary causes of external and internal auditory canal infections among other bacterial agents. The ability of disease in staphylococci depend on various virulence factors. Methicillin resistance and slime production are principal factors among these virulence factors. In recent years, chronic otitis media has been focused on and shown to have a close relationship with slime production. It has been reported that there is a close relationship between chronic otitis media and slime production.<sup>2</sup>

Slime (biofilm) produced by various microorganisms is a crucial factor for chronic infections. Biofilm production in staphylococci are associated with the production of PIA (polysaccharide intercellular adhesin). PIA is synthesized by enzymes encoded by the *ica* (intercellular adhesin) peron. Polysaccharide intercellular adhesion (PIA) is the gene product of *ica* ABDC which provides a link between cell-to-cell communication during the formation of biofilm. The *ica*ADBC operon is found in both *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. Especially, *icaA* and *icaD* in *S. aureus* and *S. epidermidis* have been reported to play an important role in terms of slime production.<sup>3-5</sup>

Slime production is reported to protect the microorganisms against degranulation phagocytosis. In addition, it is known that slime prevents opsonophagocytosis and leukocyte chemotaxis, inhibits the effects of neutrophils and reduce the activity of lymphocytes. Fur-

*L* otite esterna rappresenta il tipo di infezione uditiva più comune nell'otorinolaringoiatria. Gli stafilococchi sono le cause principali delle infezioni al condotto uditivo esterno. È stato riportato che il nuoto è tra i fattori di rischio più rilevanti per l'otite esterna<sup>1</sup>. Tra i batteri, gli stafilococchi sono la causa primaria delle infezioni al condotto uditivo esterno e interno. La capacità degli stafilococchi di causare una malattia dipende da vari fattori di virulenza. Tra di essi, la resistenza alla meticillina e la produzione di glicocalice sono i fattori principali. Recentemente ci si è concentrati sull'otite media cronica ed è stato dimostrato che essa è in stretta relazione con la produzione di glicocalice. È stato riportato che esiste una relazione stretta tra l'otite media cronica e la produzione di glicocalice<sup>2</sup>.

Il glicocalice (biofilm), prodotto da vari microrganismi, è un fattore cruciale per le infezioni croniche. La produzione di biofilm negli stafilococchi è associata alla produzione di PIA (adesina polisaccaridica intercellulare, polysaccharide intercellular adhesin). La PIA è sintetizzata dagli enzimi codificati dall'operone *ica* (adesina intercellulare, intercellular adhesin). La PIA è il prodotto del gene *ica* ABDC, che fornisce un collegamento per la comunicazione intercellulare durante la formazione del biofilm. L'operone *ica*ADBC è presente sia nello *Staphylococcus aureus* che nello *Staphylococcus epidermidis*. In particolare, è stato riportato che *icaA* e *icaD* nello *S. aureus* e nello *S. epidermidis* svolgono un ruolo importante nella produzione di glicocalice<sup>3-5</sup>.

È stato osservato che la produzione di glicocalice protegge i microrganismi dalla degranulazione e dalla fagocitosi. Inoltre, è risaputo che il glicocalice impedisce l'opsonofagocitosi e la chemiotassi dei leucociti, inibisce gli effetti dei neutrofili e riduce l'attività dei linfociti. In aggiunta, è risaputo che la produzione di glicocalice rende il trattamento antimicrobico più difficoltoso. A causa della resi-

thermore, slime production is known to make the antimicrobial treatment more difficult. Because of antibiotic resistance, slime-producing staphylococcal strains can be more difficult to eradicate by antibacterial therapy than non-slime-producing strains. Slime layer prevents the penetration of antibiotics tissue, thus, acting as a preventing or hindering agent for antimicrobial activity. Slime-forming bacteria lead to extremely stubborn infections and slime layer is more difficult to remove.<sup>6</sup>

Methicillin resistance in staphylococci is a major health problem all over the world. The mechanism of resistance to methicillin results from penicillin-binding proteins (penicillin binding Protein (PBP2a)). Methicillin-resistant staphylococci commonly causes severe and even potentially life threatening infections.<sup>7</sup> Methicillin-resistant staphylococci are serious problem for both community and health care workers. The treatment of the infections created by methicillin-resistant strains is difficult like the ones caused by slime-producing bacteria. Recently, the prevalence of methicillin-resistant strains is on the rise. Accurate and rapid diagnosis of methicillin-resistant strains is extremely important, because methicillin resistance plays an important role in the pathogenesis of staphylococcal infections.<sup>7-8</sup>

In this study, we aimed to investigate the frequency of methicillin resistance genes and slime production in staphylococci isolated from ear swabs of a group of students attending the swimming course.

### Materials and methods

This study was carried in the Department of Microbiology, Medical Faculty of Mustafa Kemal University, Hatay. Swap samples of the external auditory canal were taken from the students attending swimming course and healthy control group for the isolation of staphylococci. A total of 263 swimming students and 98 voluntaries were included to the study. Informed consent from each participant was obtained and the study protocol was approved by the Ethics Committee.

#### Bacteriological specimens

Ear canal samples were taken from the swimmers and healthy persons. A total of 263 isolates from the swimmers and 98 isolates

senza agli antibiotici, i ceppi di stafilococchi produttori di glicocalice possono essere più difficili da eradicare con la terapia antibiotica rispetto ai ceppi non-produttori di glicocalice. Lo strato di glicocalice impedisce la penetrazione degli antibiotici, quindi impedisce ad ostacola l'attività antimicrobica. I batteri produttori di glicocalice conducono a infezioni estremamente persistenti e lo strato di glicocalice è di difficile rimozione.<sup>6</sup>

La resistenza alla meticillina negli stafilococchi è un problema sanitario di rilievo in tutto il mondo. Il meccanismo della resistenza alla meticillina è causato dalle proteine leganti la penicillina (penicillin-binding protein [PBP2a]). Generalmente gli stafilococchi resistenti alla meticillina causano infezioni gravi e persino potenzialmente letali.<sup>7</sup> Essi sono un problema serio sia per la comunità che per gli operatori sanitari. Il trattamento delle infezioni causate da ceppi resistenti alla meticillina è difficoltoso tanto quanto il trattamento delle infezioni causate da batteri produttori di glicocalice. Recentemente, la prevalenza dei ceppi resistenti alla meticillina è aumentata. La diagnosi accurata e rapida di tali ceppi è estremamente importante, in quanto la resistenza alla meticillina svolge un ruolo importante nella patogenesi delle infezioni da stafilococco.<sup>7-8</sup>

L'obiettivo del presente studio è stato quello di indagare sulla frequenza dei geni per la resistenza alla meticillina e sulla produzione di glicocalice negli stafilococchi isolati da tamponi auricolari di un gruppo di studenti che frequentavano un corso di nuoto.

### Materiali e metodi

Lo studio è stato svolto nel Dipartimento di microbiologia della Facoltà di Medicina della Mustafa Kemal University, Hatay. Sono stati prelevati dei tamponi auricolari del condotto uditivo esterno dagli studenti che frequentavano un corso di nuoto e da un gruppo di controllo sano per isolare gli stafilococchi. Un totale di 263 studenti nuotatori e di 98 volontari hanno preso parte allo studio. Ciascun partecipante ha fornito il consenso informato e il protocollo di studio è stato approvato dal Comitato Etico.

#### Campioni batteriologici

Sono stati prelevati dei campioni dal condotto uditivo dei nuotatori e delle persone sane. Sono stati inclusi nello studio un totale di 263 isolati provenienti dai nuotatori e 98 isolati provenienti dai volontari. I campioni prelevati dai partecipanti sono stati posizionati in un terreno di trasporto. I

from volunteers were included to the study. The samples were taken from all participants and placed in transport media. Then, they were sent immediately to the culture laboratory for the microbial evaluations. Later, the samples were inoculated onto 5% sheep blood agar plates (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) plates. The plates were incubated at 37 °C for 48 hours. All staphylococcal isolates were identified by conventional microbiological techniques including colony morphology, Gram stain, catalase, coagulase test.<sup>9</sup> Isolated Staphylococcal strains were stored at -70 °C in Mueller-Hinton Broth (Merck, Darmstadt, Germany) supplemented with 40% glycerol (v/v).

#### DNA isolation

To isolate DNA from the staphylococcal strains, all isolates were subcultured in Mueller-Hinton Broth (Merck) overnight at 37 °C at a with shaking. The DNA isolation was carried out as previously described by Johnson *et al.*<sup>10</sup> In accordance with this method, bacterial isolates were harvested from the cultures by centrifugation at 3000×g for 15 minutes. At the end of the centrifugation, the cell pellet was resuspended in 1 mL PBS (phosphate-buffered saline) containing lysostaphin (100 µg/mL) (Sigma, USA). This mixture was incubated at 37 °C for 30 minutes. DNA extraction was made applying the classic phenol/chloroform extractions from all staphylococcal samples, and the DNA was precipitated with ethanol. The precipitate was dissolved in 50 µL of TE buffer (10 mM Tris-Cl; 1 mM EDTA [pH 8.0]) and stored at -20 °C until processing).

#### PCR detection of *mecA* and *femA* genes

Specific oligonucleotide sequences for the *mecA* and *coa* genes were selected from the study of Mehrotra *et al.*<sup>11</sup> (Table I). The PCR amplification of the genes was performed in 25 µL total volumes. PCR reaction was performed using the following conditions: the PCR mixture containing 2.5 µL 10× standard reactive buffer without MgCl<sub>2</sub> (Promega Corp., Madison, WI, USA); 200 µM of each deoxynucleoside triphosphate (ABgene, Epsom, UK), 3 mM MgCl<sub>2</sub>; 20 pmol of primers for *femA* and *mecA*, and approximately 10 ng of template DNA, and brought up to a 25 µL final volume with distilled water. Reactions were started for 5 minutes at 94 °C and placed on ice, and 1 U

*campioni sono stati quindi inviati immediatamente al laboratorio di coltura per le valutazioni microbiche. Più tardi, i campioni sono stati inoculati su delle piastre di agar sangue di pecora al 5% (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA). Le piastre sono state incubate a 37 °C per 48 ore. Tutti gli isolati di stafilococco sono stati identificati tramite tecniche microbiologiche convenzionali, incluse la morfologia della colonia, la colorazione di Gram, la catalasi e il test della coagulasi.<sup>9</sup> I ceppi di stafilococco isolati sono stati conservati a -70 °C nel brodo Mueller-Hinton (Merck, Darmstadt, Germania) con l'aggiunta di glicerolo 40% (v/v).*

#### Isolamento del DNA

*Per isolare il DNA dai ceppi di stafilococco, tutti gli isolati sono stati subcolturali nel brodo Mueller-Hinton (Merck) per una notte a 37 °C con agitazione. L'isolamento del DNA è stato eseguito come descritto precedentemente da Johnson *et al.*<sup>10</sup> In armonia con questo metodo, sono stati prelevati isolati batterici dalle colture tramite centrifugazione a 3000×g per 15 minuti. Al termine della centrifugazione, il precipitato cellulare è stato risospeso in 1 mL di PBS (soluzione salina tamponata con fosfato) contenente lisostafina (100 µg/mL) (Sigma, USA). Tale soluzione è stata incubata a 37 °C per 30 minuti. L'estrazione del DNA è stata eseguita tramite la tipica estrazione fenolo-cloroformio su tutti i campioni di stafilococco e il DNA è stato precipitato in etanolo. Il precipitato è stato dissolto in 50 µL di tampone TE (10 mM Tris-Cl; 1 mM EDTA [pH 8.0]) e conservato a -20 °C fino alla lavorazione.*

#### Rilevamento tramite PCR dei geni *mecA* e *femA*

*Dallo studio di Mehrotra *et al.*<sup>11</sup> sono state scelte sequenze oligonucleotidiche specifiche per i geni *mecA* e *coa*. (Tabella I). L'amplificazione mediante PCR dei geni è stata condotta in volumi totali di 25 µL. La reazione di PCR è stata condotta secondo le seguenti condizioni: la soluzione per la PCR contenente 2.5 µL 10× di tampone reagente standard senza MgCl<sub>2</sub> (Promega Corp., Madison, WI, USA); 200 µM di ciascun deossinucleoside-trifosfato (ABgene, Epsom, UK), 3 mM di MgCl<sub>2</sub>; 20 pmol di primer per *femA* e *mecA* e circa 10 ng di DNA stampo, portato al volume finale di 25 µL con acqua distillata. Le reazioni sono iniziate per 5 minuti a 94 °C e sono state posizionate su ghiaccio ed è stata aggiunta 1 U di Taq polimerasi (Fermentas, Waltham, MA, USA). Le miscele di reazione sono state sottoposte a 35 cicli di PCR (a 94 °C per 2 minuti, a 55 °C per 2 minuti e a 72 °C per 1 minuto). È stata inoltre appli-*

TABLE I.—The oligonucleotide sequences and length used in multiplex PCR analysis.  
 TABELLA I. — Sequenze oligonucleotidiche e lunghezze utilizzate nell'analisi PCR multiplex.

Gene	Primers	Oligonucleotide sequences (5'-3')	Oligonucleotide length (bp)
<i>femA</i>	<i>femA-1</i>	AAAAAAGCAGATAACAAGCG	132
	<i>femA-2</i>	GATAAAGAAGAAACCAGCAG	
<i>mecA</i>	<i>mec A-1</i>	ACTGCTATCCAGCCCTCAAAC	163
	<i>mec A-2</i>	CTGGTGAAGTTGTAATCTGG	
<i>icaA</i>	<i>ica A-1</i>	CCTAACTAACGAAAAGGTAG	1315
	<i>ica A-2</i>	AAGATATAGCGATAAGTGC	
<i>icaD</i>	<i>ica D-1</i>	AAACGTAAGAGAGGTGG	381
	<i>ica D-1</i>	GGCAATATGATCAAGATAC	

of *Taq* polymerase (Fermentas, Waltham, MA, USA) was added. Reaction mixtures were subjected to 35 PCR cycles (94 °C for 2 minutes, 2 minutes at 55 °C and 1 minute at 72 °C). A final elongation step at 72 °C for 7 minutes was also applied in a thermal cycler (Bioder/Thermal Blocks xp cycler, Tokyo Japan).

#### PCR detection of *icaA* and *icaD* genes

Specific oligonucleotide sequences for the *icaA* and *icaD* genes were selected from the study of Vasudevan *et al.* and Cramton *et al.*, respectively (Table I).<sup>12, 13</sup> The amplification of the *icaA* and *icaD* genes was carried out by multiplex PCR assay. PCR and amplification conditions was achieved as in the study of Duran *et al.*<sup>14</sup> The occurrence of the *icaA* and *icaD* genes was determined in staphylococcal strains isolated from the swimmers and healthy control groups and the standart (reference) strains. To identify the expected bp lengths (381 for the *icaD*, 1315 for the *icaA* bp), DNA marker with defined molecular weights in the range 100 to 2000 and reference strain were used. The PCR products were analyzed in a 2% (w/v) agarose gel in 1xTAE buffer (40 mmol/L, tris-acetate, 1 mmol/L EDTA). Ethidium bromide (0.5 µg/mL TAE)-stained DNA amplicons were visualized using a gel imaging system (Dolphin-View, Wealtec, Sparks, NV, USA).

#### Slime production

To determine of slime production in staphylococcal strains, the isolates as well as negative and positive controls were studied simultaneously. For this purpose, the slime-producing reference strain of *S. epidermidis* (ATCC 35984) and non-slime-producing reference strain of *S. epidermidis* (ATCC 12228) were selected as control strains. The slime production

*cata* in ultima fase di prolungamento a 72 °C per 7 minuti in un ciclatore termico (Bioder/Thermal Blocks xp cycler, Tokyo, Giappone).

#### Rilevamento tramite PCR dei geni *icaA* e *icaD*

Dagli studi di Vasudevan *et al.* e di Cramton *et al.* sono state selezionate delle sequenze oligonucleotidiche specifiche rispettivamente per i geni *icaA* e *icaD* (Tabella I).<sup>12, 13</sup> L'amplificazione dei geni *icaA* e *icaD* è stata condotta tramite saggio di PCR multiplex. La PCR e l'amplificazione sono state eseguite come nello studio di Duran *et al.*<sup>14</sup> L'occorrenza dei geni *icaA* e *icaD* è stata determinata nei ceppi di stafilococco isolati dai nuotatori e dal gruppo di controllo sano e in ceppi standard di riferimento. Per identificare le lunghezze delle coppie di basi attese (381 coppie di basi per *icaD*, 1315 coppie di basi per *icaA*), sono stati utilizzati marcatori genetici con pesi molecolari definiti nell'intervallo tra 100 e 2000 e ceppi di riferimento. I prodotti della PCR sono stati analizzati in un gel di agarosio al 2% (p/v) in tampone 1xTAE (40 mmol/L di tris-acetato, 1 mmol/L di EDTA). Gli ampliconi di DNA colorati con bromuro di etidio (0,5 µg/mL di TAE) sono stati visualizzati utilizzando un sistema per documentazione su gel (Dolphin-View, Wealtec, Sparks, NV, USA).

#### Produzione di glicocalice

Per determinare la produzione di glicocalice nei ceppi di stafilococco, sono stati studiati contemporaneamente gli isolati e i controlli negativi e positivi. A tal fine è stato scelto come riferimento il ceppo produttore di glicocalice di *S. epidermidis* (ATCC 35984), mentre come ceppo di controllo è stato scelto il ceppo non-produttore di glicocalice di *S. epidermidis* (ATCC 12228). La produzione di glicocalice negli isolati di stafilococco è stata valutata tramite un test su piastre di CRA (Congo Red Agar), come precedentemente descritto da Freeman *et al.* e da Duran *et al.*<sup>15, 16</sup>

in the staphylococcal isolates was evaluated by the CRA (Congo Red Agar) plate test as previously described by Freeman *et al.* and Duran *et al.*<sup>15, 16</sup>

#### Statistical analysis

The  $\chi^2$  statistical test was used for all data. It was compared the frequency of virulence genes (slime production and *mecA* gene) in staphylococci both the swimmers and healthy control group.  $P < 0.05$  was considered significant. The statistical analyses in the present study were performed by using Statistical Package for Social Sciences software (SPSS1 for Windows v.15.0, Chicago, IL, USA).

#### Results

While a total of 59 (22.4%) strains among 263 staphylococci isolated from swimmers' ear canal were positive for the *femA* gene, 77.6% (204/263) of the strains were found to be negative for *femA* gene. So, *S. aureus* and *S. epidermidis* isolation rates were 22.4% and 77.6% in 263 ear canal swab samples, respectively. While *femA* gene positivity rate was detected as 6.1% (6/98) in a total of 98 staphylococcal strains isolated from the healthy control group, the rate of coagulase negative staphylococci (CNS) was 93.9% (92/98). A statistically significant difference was found for the presence of *femA* gene between the control group of swimmers ( $P < 0.01$ ).

Methicillin resistance gene (*mecA*) was positive in 14.4% (38/263) of all isolates. Whilst the presence of *mecA* gene in a total of 59 strains of *S. aureus* was found to be 8.5% (5/59) in swimmers, this ratio was detected as 16.2% (33/204) among the CNS. The presence of the *mecA* gene among coagulase-negative strains was significantly higher than that of *S. aureus* isolates ( $P < 0.001$ ). The presence of *mecA* gene in the control group was detected as 6.1% (6/98) in 98 staphylococcal isolates. *MecA* gene was not found among *S. aureus* strains in the control group, but *mecA* gene was positive in 6 CNS (Figura 1).

While the ratio of methicillin-resistance was determined as 14.4% (38/263) by isolated PCR method, this ratio was detected as 10.3% (27/263) by disk diffusion method (as the phenotypic) in swimmers. While in 2 (3.4%) of 59 *S. aureus* strains were resistant to methicillin by disk diffusion method, methicillin resist-

#### Analisi statistica

Per tutti i dati è stato impiegato il test statistico del  $\chi^2$ . È stata confrontata la frequenza dei geni di virulenza (gene *mecA* e di produzione di glicocalice) negli stafilococchi provenienti sia dai nuotatori che dal gruppo di controllo sano. Il valore  $P < 0.05$  è stato considerato statisticamente significativo. Le analisi statistiche del presente studio sono state condotte utilizzando il software statistico per le scienze sociali (SPSS1 per Windows v.15.0, Chicago, IL, USA).

#### Risultati

Mentre un totale di 59 (22.4%) ceppi su 263 isolati di stafilococchi provenienti dai condotti uditivi dei nuotatori sono risultati positivi al gene *femA*, il 77.6% (204 su 263) dei ceppi è risultato negativo allo stesso gene. Le percentuali di isolamento di *S. aureus* e *S. epidermidis* sono quindi risultate rispettivamente del 22.4% e del 77.6% in 263 campioni di tamponi del condotto uditivo. Nel gruppo di controllo sano, mentre la percentuale di positività al gene *femA* è risultata essere del 6,1% (6 su 98) su un totale di 98 ceppi di stafilococco isolati, la percentuale di stafilococchi coagulasi-negativi (CNS) è risultata essere del 93,9% (92 su 98). È stata riscontrata una differenza statisticamente significativa per la presenza del gene *femA* nel gruppo di controllo dei nuotatori ( $P < 0.01$ ).

Il gene per la resistenza alla meticillina è risultato presente nel 14,4% (38 su 263) degli isolati. Mentre la presenza del gene *mecA* è stata riscontrata nell'8,5% (5 su 59) di un totale di 59 ceppi di *S. aureus* nei nuotatori, tale rapporto è risultato essere del 16,2% (33 su 204) nei CNS. La presenza del gene *mecA* tra i ceppi coagulasi-negativi è risultata significativamente maggiore che tra gli isolati di *S. aureus* ( $P < 0.001$ ). La presenza del gene *mecA* nel gruppo di controllo è stata appurata nel 6,1% (6 su 98) di 98 isolati di stafilococco. Il gene *mecA* non è stato rilevato nei ceppi di *S. aureus* provenienti dal gruppo di controllo ma la sua presenza è stata rilevata in 6 CNS (Figura 1).

Mentre nei nuotatori il rapporto di resistenza alla meticillina è risultato essere del 14,4% (38 su 263) con il metodo di PCR sugli isolati, lo stesso rapporto è risultato essere del 10,3% (27 su 263) con il metodo della diffusione su dischetto (come da fenotipo). Mentre 2 (il 3,4%) dei 59 ceppi di *S. aureus* sono risultati resistenti alla meticillina con il metodo della diffusione su dischetto, la resistenza fenotipica alla meticillina nei CNS è risultata essere del 9,5% (25 su 204).

I geni *icaA* e *icaD* sono stati individuati nel 78,3% (206 su 263) dei ceppi di stafilococchi provenien-

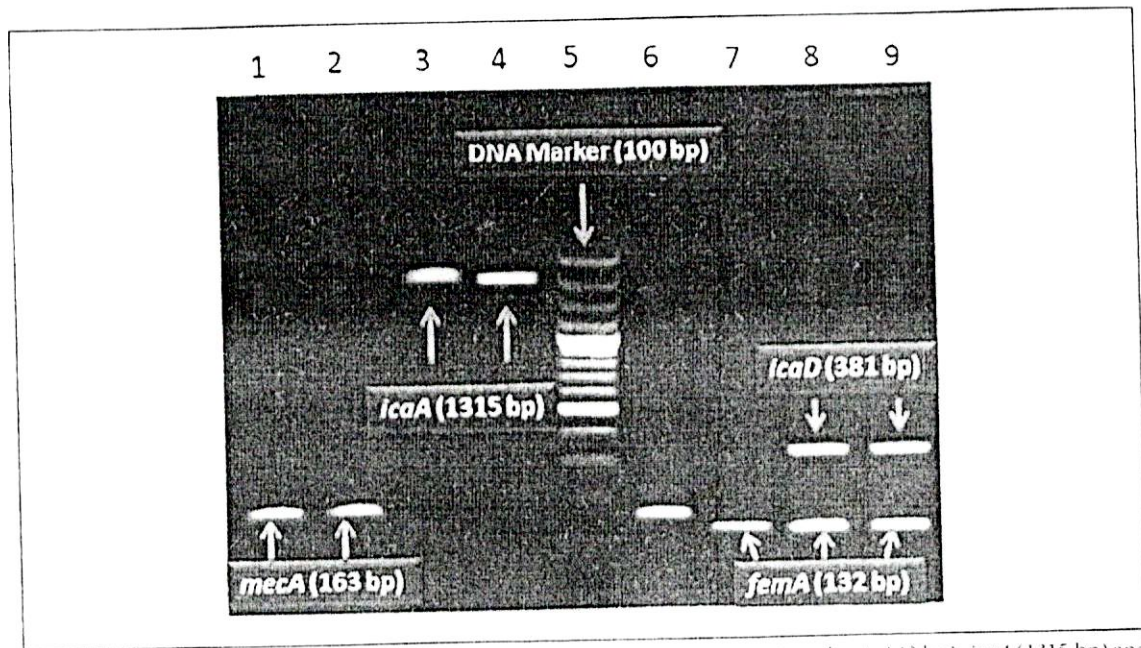


Figure 1.—The PCR products by agarose gel electrophoresis for the *mecA* (163 bp), *femA* (132 bp), *icaA* (1315 bp) and *icaD* (381 bp). DNA molecular size marker (100 bp ladder). *mecA* (163 bp): Lanes 1, 2 and 6, *femA* (132 bp): Lane 7, 8 and 9, *icaA* (1315 bp): Lane 3 and 4, *icaD* (381 bp): Lane 5 and 9.  
 Figura 1.—Prodotti PCR tramite elettroforesi su gel di agarosio per *mecA* (163 coppie di basi), *femA* (132 bp), *icaA* (1315 coppie di basi) e *icaD* (381 coppie di basi). Marcatore di peso molecolare di DNA (scala di 100 coppie di basi): *mecA* (163 coppie di basi): colonne 1, 2 e 6, *femA* (132 coppie di basi): colonne 7, 8 e 9, *icaA* (1315 coppie di basi): colonne 3 e 4, *icaD* (381 coppie di basi): colonne 5 e 9.

ance by phenotypically in CNS was found to be 9.5% (25/204).

In 206 strains of 263 (78.3%) staphylococci, the presence of *icaA* and *icaD* genes was detected as 78.3% (206/263) in staphylococci among swimmers. This ratio in *S. aureus* and CNS was 59.3% (35/59) and 83.8% (171/204), respectively. There was a statistically significant difference between *S. aureus* strains and CNS on account of the presence of *icaA* and *icaD* genes ( $P < 0.01$ ). Slime (*icaA* and *icaD*) genes in the control group was detected as 63.3% (62/98), whereas, this rate was statistically significant higher in swimmers ( $P < 0.001$ ). The frequency rates of *icaA* and *icaD* genes among *S. aureus* and CNS in healthy control group were 53.3% (8/15) and 65.1% (54/83), respectively ( $P < 0.05$ ) (Figure 1).

Whereas the slime production by phenotypic methods in staphylococci isolated from swimmers were positive in 169 (64.3%) of 263 isolates, slime production in *S. aureus* and coagulase negative staphylococci were determined as 45.8% (27/59) and 69.6% (142/204), respectively. The frequency of *icaA/icaD*

in dai nuotatori. Tale rapporto è risultato essere del 59.3% (35 su 59) e dell'83.8% (171 su 204) rispettivamente nello *S. aureus* e nei CNS. È stata riscontrata una differenza statisticamente significativa tra i ceppi di *S. aureus* e i CNS in merito alla presenza dei geni *icaA* e *icaD* ( $P < 0.01$ ). I geni per il glicocalice (*icaA* e *icaD*) sono stati individuati nel 63.3% del gruppo di controllo (62 su 98), mentre tale rapporto è risultato essere significativamente più elevato nei nuotatori ( $P < 0.001$ ). Le percentuali di frequenza dei geni *icaA* e *icaD* nello *S. aureus* e nei CNS del gruppo di controllo sono state risultate essere rispettivamente del 53.3% (8 su 15) e del 65.1% (54 su 83) ( $P < 0.05$ ) (Figura 1).

Mentre la produzione di glicocalice con metodi fenotipici negli isolati di stafilococco provenienti dai nuotatori è stata riscontrata in 169 isolati (il 64.3%) su 263, la produzione di glicocalice nello *S. aureus* e negli stafilococchi coagulasi-negativi è stata determinata rispettivamente nel 45.8% (27 su 59) e nel 69.6% (142 su 204). La frequenza dei geni *icaA/icaD* è risultata essere statisticamente più elevata rispetto al tasso di produzione di glicocalice ( $P < 0.001$ ).

La produzione di glicocalice nel gruppo di controllo è stata riscontrata nel 53.1% (51 su 98) su 98

genes was statistically rather higher than the slime production rate ( $P < 0.001$ ).

Slime production in healthy control group was found as 53.1% (51/98) among the 98 staphylococcal isolates. Similar to swimmers, slime production in CNS (55.4%; 46/83) was found statistically much higher than *S. aureus* (40%; 6/15) isolates in the control group.

### Discussion

Swimming and water sports are among important recreation activities for human. Lots of people are involved in a variety of water sports such as swimming, diving, surfing in places such as swimming pools, rivers, lakes and sea. In the event of unprotected exposure of ear canals to water, the external ear canal and tympanic membrane can be readily contaminated by highly pathogenic bacteria such as staphylococci. Due to water pressure, pathogen can reach up to the middle or inner ear and consequently, certain important ear problems such as infection and trauma can occur.<sup>17</sup>

Infections caused by various microorganisms are often regarded as the result of a defect in the disruption of protective barrier because of various predisposing factors in the ear canal. Due to exposure to moisture of the external auditory meatus, epithelial layer of the surface can be peeled, and this region becomes vulnerable to infections. Staphylococci are the most commonly isolated bacteria from the infections of the external auditory canal in swimmers.<sup>18</sup>

Methicillin resistance and slime production in staphylococci are primary virulence factors. Staphylococcal infections, especially the methicillin-resistant ones give rise to serious public health problems.<sup>19</sup> Staphylococci have a kind of protein called penicillin-binding proteins (PBP) located on the cell wall. These proteins show transpeptidase activity. They play a key role in cell wall synthesis. On the other hand, they are important targets for beta-lactam antibiotics. Methicillin-resistant staphylococci produce a kind of modified protein known as PBP2 or PBP2' which, has low-affinity for beta-lactam group of antibiotics. Methicillin resistance in staphylococci is primarily mediated by the *mecA* gene, which is responsible for production of PBP2a in methicillin-resistant staphylococci. Methicillin-resistant staphylococci are principally responsible for nosocomial

isolati di stafilococco. In maniera analoga ai nuotatori, anche nel gruppo di controllo la produzione di glicocalice negli isolati dei CNS (55.4%; 46 su 83) è risultata statisticamente molto più elevata rispetto alla stessa negli isolati di *S. aureus* (40%; 6 su 15).

### Discussione

Il nuoto e gli sport acquatici sono tra le attività ricreative più importanti per l'uomo. Molte persone praticano diversi sport acquatici come il nuoto, le immersioni, i tuffi e il surf nelle piscine, nei fiumi, nei laghi e nel mare. Qualora si verifici l'esposizione non protetta dei condotti uditivi all'acqua, il condotto uditivo esterno e la membrana timpanica possono essere contaminati rapidamente da batteri estremamente patogeni come gli stafilococchi. A causa della pressione dell'acqua, i patogeni possono raggiungere l'orecchio medio o l'orecchio interno e, di conseguenza, causare diversi problemi seri all'orecchio come un'infezione o un trauma.<sup>17</sup>

Le infezioni causate da diversi microrganismi sono spesso considerate il risultato della distruzione della barriera protettiva causata da vari fattori di predisposizione nel condotto uditivo. A causa dell'esposizione all'umidità del meato acustico esterno, lo strato epiteliale della superficie può essere rimosso, rendendo tale regione vulnerabile alle infezioni. Gli stafilococchi sono tra i batteri isolati più comunemente nei casi di infezioni al condotto uditivo esterno dei nuotatori.<sup>18</sup>

La resistenza alla meticillina e la produzione di glicocalice sono importanti fattori di virulenza. Le infezioni da stafilococco, specialmente quelle resistenti alla meticillina, sono causa di gravi problemi alla salute pubblica.<sup>19</sup> Gli stafilococchi sono dotati di proteine conosciute come proteine leganti la penicillina (PBP) ubicate sulla parete cellulare. Tali proteine mostrano un'attività transpeptidasi. Esse svolgono un ruolo fondamentale nella sintesi della parete cellulare. D'altro canto, esse sono bersagli importanti degli antibiotici beta-lattamici. Gli stafilococchi resistenti alla meticillina producono una proteina modificata conosciuta come PBP2 o PBP2' che è dotata di una bassa affinità per il gruppo di antibiotici beta-lattamici. La resistenza alla meticillina negli stafilococchi è mediata principalmente dal gene *mecA*, responsabile della produzione di PBP2a negli stafilococchi resistenti alla meticillina. Gli stafilococchi resistenti alla meticillina sono i principali responsabili delle infezioni nosocomiali. Tuttavia, recentemente sono stati osservati tassi d'incidenza elevati di ceppi resistenti alla meticillina contratti in comunità. Poiché il tasso di resistenza agli altri antibiotici nei ceppi resistenti alla



infections. However, in recent years, community-acquired methicillin-resistant strains are observed at high incidence rates. Because resistance rate to other antibiotics in methicillin-resistant strains is significantly higher than methicillin-sensitive strains, morbidity and mortality in infections caused by methicillin-resistant strains is higher than similar infections by methicillin-sensitive strains. Today, methicillin-resistant staphylococci are highly resistant to a number of antibiotics.<sup>7-20</sup>

Methicillin resistance in staphylococci is encoded by chromosomal *mecA* gene, which is found only in methicillin-resistant strains. *mecA* gene can easily be transferred from resistant strains to susceptible strains. Accurate and early diagnosis of methicillin resistance in staphylococci was reported to be extremely important to prevent the spread of methicillin resistant strains.<sup>21</sup> Treatment of infections caused by methicillin-resistant strains is rather difficult and costly. Therefore, rapid and accurate diagnosis of methicillin-resistant staphylococci are extremely important.

The frequency of methicillin resistance gene (*mecA*) has been found to be very high in various studies carried out on clinical isolates.<sup>22</sup> In a study conducted among staphylococci in 2012, Duran *et al.* showed that the occurrence rates of *mecA* gene in *S. aureus* and *S. epidermidis* strains were 25.9%, 29.6%, respectively. In this study, as in the study by Duran *et al.*, the frequency of *mecA* gene among coagulase-negative strains was found higher than *S. aureus* strains.<sup>19</sup> In our study, the presence of the *mecA* gene in *S. aureus* and *S. epidermidis* strains was determined as 8.5% and 16.2%, respectively.

In a study, the presence of the *mecA* gene in clinical samples was reported to be up to 43%.<sup>23</sup> In our study, the presence of the *mecA* gene was determined as 14.4%. The presence of the *mecA* gene in this study was found lower than in the studies by Duran *et al.* and Japoni *et al.*<sup>19, 23</sup> We think that the lower rate in our study might be due to its community-based nature.

The selection of the appropriate antibiotics to treat the infections caused by staphylococci is crucial for the control of the infection. Infections caused by methicillin-resistant strains have usually been reported to be multi-drug resistant.<sup>7</sup> Therefore, rapid and accurate detection of methicillin resistance is vital in view of the success of treatment. Genotypic determi-

*meticillina è significativamente superiore rispetto a quello dei ceppi sensibili alla meticillina, la morbilità e la mortalità nelle infezioni causate da ceppi resistenti alla meticillina sono maggiori che in infezioni simili causate da ceppi sensibili alla meticillina. Al giorno d'oggi, gli stafilococchi resistenti alla meticillina sono altamente resistenti a diversi antibiotici*<sup>7, 20</sup>.

*La resistenza alla meticillina negli stafilococchi è codificata dal gene cromosomiale mecA, riscontrato solo nei ceppi resistenti alla meticillina. Il gene mecA può essere facilmente trasferito da ceppi resistenti a ceppi sensibili. La diagnosi accurata e precoce della resistenza alla meticillina negli stafilococchi risulta essere estremamente importante per prevenire la diffusione dei ceppi resistenti alla meticillina*<sup>21</sup>. *Il trattamento delle infezioni causate dai ceppi resistenti alla meticillina è difficile e costoso. Per questo motivo, la diagnosi rapida e accurata degli stafilococchi resistenti alla meticillina è estremamente importante.*

*La frequenza del gene per la resistenza alla meticillina (mecA) è risultata essere molto elevata in diversi studi svolti su isolati clinici*<sup>22</sup>. *In uno studio condotto sugli stafilococchi nel 2012, Duran et al. hanno mostrato che i tassi di presenza del gene mecA in ceppi di S. aureus e di S. epidermidis erano rispettivamente del 25,9% e del 29,6%. Nel presente studio, così come nello studio di Duran et al., la frequenza del gene mecA tra i ceppi coagulase-negativi è risultata essere più elevata che nei ceppi di S. aureus*<sup>19</sup>. *Nel nostro studio, la presenza del gene mecA è stata accertata rispettivamente nell'8,5% e nel 16,2% dei ceppi di S. aureus e di S. epidermidis.*

*In uno studio, il tasso di presenza del gene mecA nei campioni clinici è risultato essere del 43%*<sup>23</sup>. *Nel nostro studio, il tasso di presenza del gene mecA è risultato essere del 14,4%. La presenza del gene mecA nel presente studio è risultata inferiore a quella negli studi di Duran et al. e di Japoni et al.*<sup>19, 23</sup>. *Riteniamo che il tasso inferiore riscontrato nel nostro studio possa essere dovuto alla sua natura a base comunitaria.*

*La scelta di antibiotici appropriati nel trattamento dell'infezione causata dagli stafilococchi è cruciale per il controllo dell'infezione stessa. Le infezioni causate da ceppi resistenti alla meticillina sono state generalmente riportate come multi-farmacoresistenti*<sup>7</sup>. *Pertanto una rilevazione rapida e accurata della resistenza alla meticillina è vitale al fine del successo del trattamento. La determinazione genotipica della resistenza alla meticillina negli stafilococchi è estremamente importante. Nel nostro studio, la percentuale di resistenza alla meticillina con metodi genotipici e fenotipici è risultata essere rispettivamente del 14,4% e del 10,3%. È stata ri-*

nation of methicillin resistance in staphylococci is extremely important. In our study, methicillin-resistance by genotypic and phenotypic methods was detected as 14.4% and 10.3%, respectively. There was a statistically significant difference between these two methods.

There are two types of methicillin resistance in staphylococci, namely homogeneous and heterogeneous methicillin-resistance. *MecA* gene is not included in a heterogeneous-resistant strains. In these kinds of strains, although bacteria are resistant to methicillin, they can be identified as sensitive. Misdiagnosis of methicillin resistant staphylococci will lead to treatment failure. In the detection of this kind of resistance, the most accurate way is demonstration of the presence of the *mecA* gene by PCR method.<sup>7</sup>

The misdiagnosis of methicillin resistance in *Staphylococcus* leads to treatment failures or unnecessary use of glycopeptide antibiotics. As a result, the development of glycopeptide resistance is triggered.<sup>20, 24</sup>

The concentration of inoculation can be effective on the test results. This is another important handicap of phenotypic methods. The concentration of inoculation has been reported to lead serious problems in several studies of phenotypic resistance.<sup>25, 26</sup>

Statistically significant difference was found between the frequency of *mecA* and the rate of methicillin resistance by phenotypically ( $P < 0.001$ ). Statistically significant difference was found between these two methods in terms of detection of methicillin resistance gene in the healthy control group ( $P < 0.05$ ).

Another important virulence factor in staphylococci is slime production. Main component of biofilm formation in staphylococci is a polysaccharide intercellular adhesion molecule encoded by the *ica* (*icaA*, *icaB*, *icaC*, and *icaD*) operon.<sup>27</sup>

*icaA* and *icaD* genes have been reported to play an essential role for the slime production in staphylococci (both *S. aureus* and *S. epidermidis*).<sup>28</sup> In a study conducted by Wang *et al.*, slime production was investigated in *S. aureus* strains isolated from lower respiratory tract infections. Slime production was found as 70.6% among 119 *S. aureus* strains. In this study, slime production was determined to be lower (59.3%) than in the study by Wang *et al.* (70.6%) in *S. aureus* isolates.<sup>17</sup>

Duran *et al.* investigated the frequency of *icaA/icaD* genes in 2010 in staphylococci iso-

scontrata una differenza statisticamente significativa tra i due metodi.

Esistono due tipi di resistenza alla meticillina negli stafilococchi: la resistenza omogenea e quella eterogenea. Il gene *mecA* non è presente nei ceppi con resistenza eterogenea. Questi ceppi, nonostante i batteri siano resistenti alla meticillina, possono essere identificati come sensibili. La diagnosi erronea della resistenza alla penicillina negli stafilococchi conduce al fallimento del trattamento. Al fine di rilevare questo tipo di resistenza, il metodo più affidabile è di dimostrare la presenza del gene *mecA* tramite PCR.<sup>7</sup>

La diagnosi erronea della resistenza alla meticillina nello stafilococco conduce al fallimento dei trattamenti o all'uso non necessario degli antibiotici glicopeptidici. Come risultato, ciò comporta lo sviluppo della resistenza ai glicopeptidi.<sup>20, 24</sup>

La concentrazione dell'inoculo può essere efficace nei risultati dei test. Si tratta di un'altra importante debolezza dei metodi fenotipici. È stato riportato che la concentrazione dell'inoculo porta a gravi problemi in diversi studi sulla resistenza fenotipica.<sup>25, 26</sup>

È stata riscontrata una differenza statisticamente significativa tra la frequenza del gene *mecA* e il tasso di resistenza alla meticillina con metodi fenotipici ( $P < 0.001$ ). Inoltre, è stata riscontrata una differenza statisticamente significativa tra i due metodi in termini di rilevamento del gene per la resistenza alla meticillina nel gruppo di controllo sano ( $P < 0.05$ ).

Un altro fattore di virulenza importante negli stafilococchi è la produzione di glicocalice. Il componente principale per la formazione del biofilm negli stafilococchi è una molecola polisaccaridica di adesione intercellulare codificata dall'operone *ica* (*icaA*, *icaB*, *icaC* e *icaD*).<sup>27</sup>

È stato riportato che i geni *icaA* e *icaD* svolgono un ruolo essenziale nella produzione di glicocalice negli stafilococchi (sia nello *S. aureus* che nello *S. epidermidis*).<sup>28</sup> In uno studio condotto da Wang *et al.* si è indagato sulla produzione di glicocalice in ceppi di *S. aureus* isolati da infezioni al tratto respiratorio inferiore. La produzione di glicocalice è stata riscontrata nel 70,6% di 119 ceppi di *S. aureus*. Nel presente studio, la produzione di glicocalice riscontrata è stata inferiore (59,3%) rispetto a quella riportata nello studio di Wang *et al.* (70,6%) negli isolati di *S. aureus*.<sup>17</sup>

Nel 2010 Duran *et al.* hanno indagato sulla frequenza dei geni *icaA/icaD* negli isolati di stafilococchi provenienti da campioni di tampone nasale di pazienti con protesi ortopediche. La presenza dei geni *icaA/icaD* è stata riscontrata rispettivamente nel 75,4% e nell'80% degli *S. aureus* e degli *S. epidermidis*.<sup>29</sup>

lated from nasal swab samples from patients with orthopedic implants, the frequency of *icaA/icaD* genes in *S. aureus* and *S. epidermidis* was found as 75.4% and 80%, respectively.<sup>29</sup>

In another study carried out by Duran *et al.* in 2010, slime production and slime genes were investigated in staphylococci isolated from surgery wound infections in orthopedic surgery. In that study, while the slime genes frequency was found as 66.2% by multiplex PCR method, and the rate of slime production by phenotypic method was quite low.<sup>14</sup> In our study, the presence of *icaA/icaD* in staphylococci isolated from external ears of swimmers was found to be 78.3%, whereas this ratio was 64.3% in the control group. These results proved to be in parallel with those by Wang *et al.* and those by Duran *et al.* It is clear that these results are similar to the parallel studies by Wang *et al.* and by Duran *et al.*<sup>14, 29</sup>

The phenotypic effect of a gene depends on its expressing. Phenotypical slime production may not be detected in all strains containing slime genes. So, in order to see the phenotypic effect of a gene, besides the demonstration of the presence of that gene by molecular methods, this gene must be expressed.<sup>16</sup>

Staphylococci are among the important pathogens that cause various infections in humans, and main cause of ear canal infections. Slime production is known to have great importance in the pathogenesis of staphylococci.<sup>12</sup>

In a study conducted by Mathur *et al.* among 152 clinical staphylococcal strains, slime production by phenotypically has been found as 57.8%.<sup>30</sup> These results are also very similar to the ones in our study. Unlike in our study, slime production in staphylococci isolated from catheter-related infections was determined at a higher rate in *S. aureus* (61%) than *S. epidermidis* (49%) isolates in the study by Arciola *et al.*<sup>5</sup> In a study conducted by Melek *et al.* as in with our study, the occurrence of *icaA/icaD* was identified a higher rate (85.7%) in *S. epidermidis* than *S. aureus* (81.6%) isolates in staphylococci isolated from nasal swab samples.<sup>31</sup>

## Conclusions

In conclusion, the rate of methicillin resistance and slime production in staphylococci and also, the colonization rate of *S. aureus*

*In un altro studio svolto da Duran et al. nel 2010, si è indagato sulla produzione di glicocalice e sui geni per il glicocalice in isolati di stafilococco provenienti da infezioni di ferite chirurgiche nella chirurgia ortopedica. In tale studio, mentre la frequenza dei geni per il glicocalice è stata riscontrata nel 66,2% dei casi utilizzando il metodo della PCR multiplex, la percentuale di produzione di glicocalice tramite metodo fenotipico è risultata abbastanza bassa<sup>14</sup>. Nel presente studio, la presenza di icaA/icaD è stata riscontrata nel 78,3% degli isolati di stafilococco provenienti dall'orecchio esterno dei nuotatori, mentre il valore per il gruppo di controllo è risultato essere del 64,3%. Tali risultati sono in linea con quelli riscontrati da Wang et al. e quelli riscontrati da Duran et al. È evidente che i risultati sono simili agli studi paralleli di Wang et al. e di Duran et al.<sup>14, 29</sup>*

*L'effetto fenotipico di un gene dipende dalla sua espressione. La produzione di glicocalice fenotipica potrebbe non essere individuabile in tutti i ceppi nei quali i geni per il glicocalice sono presenti. Perciò, affinché l'effetto fenotipico di un gene sia visibile, oltre alla dimostrazione della presenza di tale gene tramite i metodi molecolari è necessario che il gene sia espresso.<sup>16</sup>*

*Gli stafilococchi sono tra i più importanti patogeni causa di diverse infezioni negli esseri umani e sono la causa principale delle infezioni al condotto uditivo. È risaputo che la produzione di glicocalice è molto importante nella patogenesi degli stafilococchi.<sup>12</sup>*

*In uno studio condotto da Mathur et al. su 152 ceppi clinici di stafilococco, la produzione fenotipica di glicocalice è stata osservata nel 57,8% dei casi.<sup>30</sup> Tali risultati sono molto simili a quelli ottenuti dal nostro studio. Nello studio di Arciola et al.<sup>5</sup>, al contrario di quanto accade nel presente studio, la produzione di glicocalice negli isolati di stafilococco provenienti da infezioni correlate al catetere è stata riscontrata in misura maggiore negli isolati di *S. aureus* (61%) piuttosto che in quelli di *S. epidermidis* (49%). In uno studio condotto da Melek et al., la presenza di icaA/icaD, in maniera analoga al presente studio, è stata riscontrata in misura maggiore (85,7%) negli isolati di stafilococco provenienti da campioni di tampone nasale di *S. epidermidis* piuttosto che in quelli di *S. aureus* (81,6%).<sup>31</sup>*

## Conclusioni

*In definitiva, i tassi di resistenza alla meticillina e di produzione di glicocalice negli stafilococchi e i tassi di colonizzazione di *S. aureus* nel condotto*

within ear canal in the students attending swimming course was found higher than in the healthy volunteers. The false negativity or false positivity can be determined in drug resistance studies by phenotypic methods. For the demonstration of heterogeneous resistance, PCR-based studies should be extended for investigation of methicillin resistance. It is recommended that tests for both methicillin resistance and slime production be performed by molecular-based methods, which give more accurate and faster results.

External auditory canal infections are very important and common among swimmers. Swimmers' ear is an infection or inflammation of the canal between the eardrum and the outer ear. This condition can be triggered by exposure to water. Because, swimming and water sports that interfere with the normal functioning of the external auditory canal can predispose to ear canal infections. Ear canal infections are caused by many types of bacteria or fungi. Staphylococci carrying the *mecA* and *icaA-icaD* genes are very dangerous microorganisms among these pathogens. Staphylococci especially methicillin resistant and slime producing strains cause of significant morbidity and mortality. Evaluation of the ear swab samples microbiologically is key in preventing spread of infection. To prevent outbreaks of swimming pool-associated illness, periodically, athletes should be screened for pathogenic microorganisms such as slime-producing and methicillin resistant staphylococci. Rapid and accurate detection of potential pathogenic staphylococci and treatment are extremely important for swimmers of the same swimming pool.

*uditivo riscontrati negli studenti che frequentavano il corso di nuoto sono risultati più elevati che tra i volontari sani. La falsa negatività o la falsa positività può essere determinata negli studi di resistenza ai farmaci tramite metodi fenotipici. Per dimostrare la resistenza eterogenea, gli studi basati sulla PCR devono includere anche indagini sulla resistenza alla meticillina. Si raccomanda che sia i test per la resistenza alla meticillina che quelli per la produzione di glicocalice vengano condotti con metodi molecolari, i quali sono in grado di restituire risultati più accurati e più rapidi*

*Le infezioni del condotto uditivo esterno sono molto importanti e comuni tra i nuotatori. L'orecchio del nuotatore è un'infezione o un'infiammazione del condotto tra il timpano e l'orecchio esterno. Tale patologia può essere scatenata dall'esposizione all'acqua. Ciò avviene in quanto il nuoto e gli sport acquatici possono interferire con il normale funzionamento del condotto uditivo esterno e possono predisporre alle infezioni del condotto uditivo. Le infezioni del condotto uditivo sono causate da diversi tipi di batteri o di funghi. Tra questi patogeni, gli stafilococchi dotati dei geni *mecA* e *icaA-icaD* sono microrganismi molto pericolosi. Gli stafilococchi, specialmente i ceppi resistenti alla meticillina e quelli produttori di glicocalice, sono cause significative di morbilità e di mortalità. La valutazione microbiologica dei campioni di tampone auricolare è di fondamentale importanza per impedire il diffondersi dell'infezione. Al fine di prevenire epidemie di malattie associate alla piscina, gli atleti devono essere esaminati periodicamente per i microrganismi patogeni, come gli stafilococchi produttori di glicocalice e gli stafilococchi resistenti alla meticillina. La rilevazione rapida e accurata degli stafilococchi potenzialmente patogeni e il loro trattamento sono estremamente importanti per i nuotatori che utilizzano la stessa piscina*

#### References Bibliografia

- 1) Narayan S, Swift A. Otitis externa. A clinical review. *Br J Hosp Med* 2011;72:554-8.
- 2) Post JC. Direct evidence of bacterial biofilms in otitis media. *Laryngoscope* 2001;111:2085-94.
- 3) Petrelli D, Zampaloni C, D'Ercole S, Prenna M, Ballarini P, Ripa 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.
- 4) Cramton SE, Gerke C, Schnell NE, Nichols WW, Gotz F. The intercellular adhesion (*ica*) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. *Infect Immun* 1999;67:5427-33.
- 5) 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.
- 6) Götz F. Staphylococcus and biofilms. *Mol Microbiol* 2002;43:1367-78.
- 7) Chambers HF. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implication. *Clin Microbiol Rev* 1997;10:781-91.
- 8) Gradie E, Valera L, Aleksunes S, Bonner D, Fung G. Correlation between genotype and phenotypic categorization of staphylococci based on methicillin susceptibility and resistance. *J Clin Microbiol* 2001;39:2961-5.
- 9) Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Stanley JT, Williams TS. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Ninth edition. Baltimore, MD, USA: William and Wilkins; 1994. p. 532.
- 10) Johnson WM, Tyler SD, Ewan EP, Ashton EE, Pollard DR, Rozee K. Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1991;29:426-30.
- 11) Mehrotra M, Wang G, Johnson WM. Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. *J Clin Microbiol* 2000;38:1032-5.
- 12) Vasudevan P, Nair MK, Annamalai T, Venkatarayanan KS. Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. *Vet Microbiol* 2003;92:179-85.
- 13) Cramton SE, Gerke C, Schnell NE, Nichols WW, Gotz F. The intercellular adhesion (*ica*) locus is present in *S. aureus*

- and is required for biofilm formation. *Infect Immun* 1999;67:5427-33.
- 14) Duran N, Dogramaci Y, Demir C, Ozer B, Kalaci A. Detection of slime and methicillin resistance genes in *Staphylococci* isolated from nasal samples of patients with orthopaedic implants. *Med Sci Monit* 2010;16:BR271-7.
- 15) Freeman DJ, Falkiner FR, Keane CT. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *J Clin Pathol* 1989;42:872-4.
- 16) Duran N, Dogramaci Y, Ozer B, Demir C, Kalaci A. Detection of adhesin genes and slime production among *Staphylococci* in orthopaedic surgical wounds. *Afr J Microbiol Res* 2010;4:708-15.
- 17) Wang MC, Liu CY, Shiao AS, Wang T. Ear problems in swimmers. *J Chin Med Assoc* 2005;68:547-52.
- 18) Duran N, Ocak S, Eskioçak AF. *Staphylococcus aureus* nasal carriage among the diabetic and non-diabetic haemodialysis patients. *Int J Clin Pract* 2006;60:1204-9.
- 19) Duran N, Ozer B, Duran GG, Onlen Y, Demir C. Antibiotic resistance genes & susceptibility patterns in staphylococci. *Indian J Med Res* 2012;135:389-96.
- 20) Chambers HF. Detection of methicillin-resistant staphylococci. *Infect Dis Clin North Am* 1993;7:425-33.
- 21) Vaez H, Tabaraei A, Moradi A, Ghaemi EA. Evaluation of methicillin resistance *Staphylococcus aureus* isolated from patients in Golestan province-north of Iran. *Afr J Microbiol Res* 2011;5:432-6.
- 22) Ciftci IH, Altindis M, Cetinkaya Z, Asik G, Aktepe OC. Investigation of *mecA* genes in staphylococcus strains isolated from clinical samples. *Kocatepe Med J* 2009;10:17-20.
- 23) Japoni A, Alborzi A, Orafi F, Rasouli M, Farshad S. Distribution patterns of methicillin resistance genes (*mecA*) in *Staphylococcus aureus* isolated from clinical specimens. *Iranian Biomed J* 2004;8:173-8.
- 24) Skulnick M, Simor AE, Gregson D. Evaluation of commercial and standard methodology for determination of oxacillin susceptibility in *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 1996;30:1985-8.
- 25) Bozdogan B, Esel D, Whitener C, Browne FA, Appelbaum PC. Antibacterial susceptibility of a vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* strain isolated at the Hershey Medical Center. *J Antimicrob Chemother* 2003;52:861-8.
- 26) Swenson JM. New tests for the detection of oxacillin resistant *Staphylococcus aureus*. *J Microbiol News* 2002;24:159-63.
- 27) 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;3:342-51.
- 28) Yazdani R, Oshaghi M, Havayi A, Salehi R, Sadeghizadeh M, Foroghesh H. Detection of *icaAD* gene and biofilm formation in *Staphylococcus aureus* isolates from wound infections. *Iranian J Publ Health* 2006;35:25-8.
- 29) Wang L, Yu F, Yang L, Li Q, Zhang X, Zeng Y, et al. Prevalence of virulence genes and biofilm formation among *Staphylococcus aureus* clinical isolates associated with lower respiratory infection. *Afr J Microbiol Res* 2010;4:2566-9.
- 30) 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;24:25-9.
- 31) Melek IM, Duran N, Duran GG, Duman T, Okuyucu E. The frequency of slime, adhesin and methicillin resistance genes among staphylococci isolated from nasal samples of multiple sclerosis patients. *Afr J Microbiol Res* 2011;5:453-60.

*Funding*—This work was supported by the Research Fund of Mustafa Kemal University.

*Conflicts of interest*—The authors certify that there is no conflict of interest with any financial organization regarding the material discussed in the manuscript.

Manuscript accepted: June 3, 2015. - Manuscript received: February 19, 2016.