

Hidrojel ve Silikon Hidrojel Kontakt Lens Kullanımı ile Konjonktivadaki Koagülaz Negatif Stafilokok Popülasyonu ve Biyofilm Oluşturan *Staphylococcus epidermidis* Arasındaki İlişki

The Relationship Between the Use of Hydrogel and Silicone Hydrogel Contact Lenses and Coagulase-Negative Staphylococci Population in the Conjunctiva and Biofilm Forming Staphylococcus epidermidis

Zeynep Güngördü Dalar*[Ⓜ], Güzin İskeleli**[Ⓜ], Mert Ahmet Kuşkuçcu*[Ⓜ], Mehmet Demirci***[Ⓜ], Penbe Çağatay****[Ⓜ], Sevgi Ergin*[Ⓜ], Aysel Karataş*****[Ⓜ], Barış Ata Borsa*****[Ⓜ], Zeynep Taner*[Ⓜ], Süleyman Pelit*****[Ⓜ], Müzeyyen Mamal Torun*****[Ⓜ], Arif Kaygusuz*[Ⓜ], Kenan Midilli*[Ⓜ], Bekir S. Kocazeybek*[Ⓜ], Hrisi Bahar Tokman*[Ⓜ]

* İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

** İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Göz Hastalıkları Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

*** Kırklareli Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kırklareli, Türkiye

**** Balıkesir Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim Anabilim Dalı, Balıkesir, Türkiye

***** İstanbul Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Kliniği, İstanbul, Türkiye

***** Linköping University, Department of Physics Chemistry and Biology, Division of Molecular Surface Physics and Nanoscience,

Linköping, İsveç

***** Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Şişli Hamidiye Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, İstanbul, Türkiye

***** Bahçeşehir Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

Atf/Cite as: Güngördü Dalar Z, İskeleli G, Kuşkuçcu MA, Demirci M, Çağatay P, Ergin S, et al. Hidrojel ve silikon hidrojel kontakt lens kullanımı ile konjonktivadaki koagülaz negatif stafilokok popülasyonu ve biyofilm oluşturan *Staphylococcus epidermidis* arasındaki ilişki, Türk Mikrobiyoloji Cemiyet Derg. 2021;51(4):406-14.

Öz

Amaç: Konjonktiva mikrobiyotasında kolonize olan en önemli bakteriler *Staphylococcus epidermidis*, difteroid çomaklar, *Corynebacterium* spp. ve *Cutibacterium acnes*'tir. Özellikle *S. epidermidis*'in biyofilm oluşturmaya hazır olan kontakt lense bağlı enfeksiyonların gelişiminde önem taşımaktadır. Bu amaçla çalışmamızda, lens kullanmaya hazırlanan 140 hastanın (90 hidrojel, 50 silikon hidrojel), lens kullanımından önce ve sonra alınan konjonktiva sürüntülerinde biyofilm oluşturan *S. epidermidis* ve diğer koagülaz negatif stafilokok türlerinin varlığındaki değişimleri incelemeyi amaçladık.

Yöntem: İzole edilen koagülaz negatif stafilokoklar standart klinik mikrobiyolojik yöntemlerle, *S. epidermidis* türleri API Staph ile tanımlandıktan sonra slime üretimleri; Kongo kırmızılı agar, standart tüp ve moleküler yöntemlerle belirlenmiştir.

Bulgular: *S. epidermidis*, lens kullanım öncesi ve sonrası konjonktival mikrobiyotada en sık izole edilen tür olmuştur. Lens kullanım öncesi konjonktiva mikrobiyotasında slime üreten *S. epidermidis* oranları %45-50 iken, hidrojel kontakt lens kullanım sonrası %59, silikon hidrojel kontakt lens kullanım sonrası ise %70.2 olarak belirlenmiştir. Slime üretiminin araştırılması için, 161 *S. epidermidis* kökeninin Kongo Kırmızılı Agar besiyeri kullanılarak yapılan değerlendirilmesinde, 82'si (%50.9), standart tüp yöntemiyle 61'i (%37.8), moleküler yöntemlerle 91'i (%56.5) pozitif bulunmuştur.

Sonuç: Çalışmamızın sonucu, lens kullanım öncesi ve sonrası bakteri oranlarında anlamlı değişimlerin olmadığı ama özellikle *S. epidermidis* gibi bakterilerin, slime üretimiyle kontakt lens faktörünün de kullanarak enfeksiyonlara zemin hazırlayabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca; moleküler yöntemlerin ve Kongo Kırmızılı Agar yönteminin, Standart Tüp yöntemine göre daha güvenilir olduğu belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Kontakt lens, konjonktival mikrobiyota, biyofilm

ABSTRACT

Objective: The most important bacteria of the conjunctival microbiota are *Staphylococcus epidermidis*, diptheroid rods, *Corynebacterium* spp. and *Cutibacterium acnes*. Especially biofilm formation of *S. epidermidis* is very important for contact lens related infections. For this purpose, we aimed to examine the changes in the presence of biofilm-forming *S. epidermidis* and other coagulase-negative staphylococci in conjunctival swabs taken before and after lens usage in 140 patients (90 hydrogel, 50 silicone hydrogel) who were prepared to wear lenses.

Methods: Coagulase-negative staphylococci isolated from the conjunctival microbiota identified standard clinical microbiological methods, after identification of *S. epidermidis* strains with API Staph; Slime production was determined by Congo red agar, standard tube and molecular methods.

Results: *S. epidermidis* was the most frequently isolated species in conjunctival microbiota before and after lens usage. Before lens usage, slime positive *S. epidermidis* strains were found as 45-50% but after lens usage it was 59% in hydrogel contact lens users and 70.2% in silicone hydrogel contact lens users. For the investigation of slime production, 82 (50.9%) of 161 *S. epidermidis* strains were found positive by using Congo red agar, 61 (37.8%) by standard tube method and 91 (56.5%) by molecular methods.

Conclusion: The result of our study suggests that there are no significant changes in bacterial ratios before and after lens use, but bacteria such as *S. epidermidis* can predispose to infections by using slime production and contact lens factor. Also; molecular methods and Congo Red Agar method were found to be more reliable than the Standard Tube method.

Keywords: Contact lenses, conjunctival microbiota, biofilm

Alındığı tarih / Received:
09.06.2021 / 09.June.2021

Kabul tarihi / Accepted:
02.08.2021 / 02.August.2021

Erken çevrimiçi / First Published:
23.09.2021 / 23.September.2021

ORCID Kayıtları

Z. G. Dalar 0000-0003-2177-4235
G. İskeleli 0000-0001-9253-7646
M. A. Kuşkuçcu 0000-0001-8735-5725
M. Demirci 0000-0001-9670-2426
P. Çağatay 0000-0002-0058-4152
S. Ergin 0000-0003-2039-3078
A. Karataş 0000-0001-8916-8499
B. A. Borsa 0000-0003-4285-2933
Z. Taner 0000-0003-0336-1832
S. Pelit 0000-0002-0028-4264
M. Mamal Torun 0000-0002-8510-3206
A. Kaygusuz 0000-0002-1404-1933
K. Midilli 0000-0003-3007-3422
B. S. Kocazeybek 0000-0003-1072-3846
H. B. Tokman 0000-0002-2205-5120

✉ hrisibahar@gmail.com

© Telif hakkı Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti'ne aittir. Logos Tıp Yayıncılık tarafından yayınlanmaktadır.
Bu dergide yayınlanan bütün makaleler Creative Commons Atf-Gayri Ticari 4.0 Uluslararası Lisansı ile lisanslanmıştır.
© Copyright Turkish Society of Microbiology. This journal published by Logos Medical Publishing.
Licensed by Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY)

GİRİŞ

Konjonktiva mikrobiyotası doğumdan itibaren oluşmakta ve göz yüzeyinin korunmasında yer alan savunma mekanizmaları arasında bu mikrobiyotanın önemli rolü olduğu bilinmektedir⁽¹⁾. Konjonktiva mikrobiyotasında en yoğun kolonize olan bakteri *Staphylococcus epidermidis* olmakla beraber bunu *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium* spp. ve anaerob bakterilerden *Cutibacterium acnes*'in izlediği gösterilmiştir⁽²⁾. Son yıllarda tıbbi alanda gelişen uygulamalara paralel olarak, görme bozuklukları için geliştirilen kontakt lensler, oldukça yaygın kullanım alanına sahip biyomateriyallerdir. Ancak bunların, konjonktiva epitelinde mikrotravmalar oluşturarak, gözün fiziksel savunmasında zayıflamalara neden oldukları ve bu durumun başta *S. epidermidis* olmak üzere konjonktivadaki mikrobiyotayı etkileyerek bir yandan potansiyel patojen bakterilerin göz yüzeyine tutunmasına, diğer yandan normal konjonktival mikrobiyotanın parçası olan gerek *S. epidermidis*'in, gerekse diğer koagülaz negatif stafilokokların (KNS), korneaya ulaşarak enfeksiyona neden olmalarına zemin oluşturduğu da bilinmektedir^(3,4). Özellikle slime üreten mikroorganizmalarla kolonize olan bu biyomateriyallerin, mikrobiyal keratitlere kaynak oluşturduğu gösterildikten sonra, kontakt lens yüzeylerine yapışan ve biyofilm oluşturabilen mikroorganizmaların göz enfeksiyonlarındaki önemi daha iyi kavranmıştır^(5,6). Sankaridurg ve ark.'nın⁽⁷⁾, kontakt lens kullanımına bağlı olarak konjonktiva mikrobiyotasında biyofilm oluşturma özelliğine sahip *S. epidermidis*'in ve *C. acnes*'in kolonizasyonunda artış görülmesine, buna karşın bakteri türlerinin çeşitliliği bakımından bir artış görülmemesine dayanan çalışma bulguları, bu konuyu destekleyen iyi bir örnektir. *S. epidermidis*'te, biyofilm oluşumundan icaADBC operonunun ürünü olan polisakkarit yapıda hücrelerarası adezin (polysaccharide intercellular adhesin, PIA) sorumlu tutulmaktadır. IcaADBC operonu stafilokoklarda biyofilm oluşumunun hücrelerarası adezyon kısmında görev yapan PIA'nın oluşumunda yer alan poli-N-asetil-beta-1-6-glukozamin (PNAG) oligomerlerini sentezlettirir. *IcaA* ve *icaD* genlerinin görevi üridin difosfo (UDP)-N-asetil glukozamini substrat olarak kullanarak şeker oligomerleri sentezlettir-

mektir. *IcaA* tek başına düşük N-asetilglukozamin transferaz aktivitesi gösterirken, *icaD* geni varlığında enzim aktivitesinde belirgin artış gösterilmiştir. Bu nedenle *icaA* ve *icaD* genlerinin saptandığı *S. epidermidis* kökenlerinin güçlü bir biyofilm oluşturma potansiyeline sahip oldukları kabul edilmektedir⁽⁸⁾.

Görme bozukluklarında en sık kullanılan kontakt lensler, hidrofilik monomerlerin polimerizasyonu veya kopolimerizasyonu ile elde edilen ve genellikle sentetik yapıda olan yumuşak kontakt lenslerdir. Bu lenslerin hidrojel yapıda olanlarında, değişik oranlarda su tutma potansiyeli en önemli özellik olarak belirtilmekte ve bunun, materyalin oksijen geçirgenliği, elastikliği, ışığı kırma gücü ve gerilmeye karşı dayanıklılığında rol oynadığı bildirilmektedir⁽⁹⁾. Son yıllarda, silikonun yüksek oksijen geçirme özelliğiyle hidrojin yüksek su ve oksijen taşıma özelliğinin kombine edilmesi ile, silikon ve hidrojel materyallerinin birleştirilmesi sonucu geliştirilen Silikon-Hidrojel yapıda yumuşak kontakt lenslerin de yaygın bir kullanım alanına sahip olduğu ifade edilmektedir⁽¹⁰⁾.

Ülkemizde Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK)'nin 2018 yılında yaptığı sağlık araştırmasına göre, 15 yaş ve üzeri bireylerin gözlük veya kontakt lens kullanımlarının nüfusa oranının %35.6 olduğunu bildirilmiştir⁽¹¹⁾. Ülkemizde yapılan bir çalışmada mikrobiyal keratit tanısı almış hastaların kültürlerinden etken olarak en sık *S. epidermidis*'in (%19.2) izole edildiği belirtilmiş, korneal ülser zemin oluşturabilecek kontakt lens kullanımının %43.1'lik bir oranla en sık karşılaşılan neden olduğu bildirilmiştir⁽¹²⁾.

Araştırdığımız kadarıyla ülkemizde alanında ilk olduğunu gördüğümüz bu çalışmada: (1) Konjonktiva mikrobiyotasında *icaA* ve *icaD* genlerine sahip *S. epidermidis* ve diğer KNS'ların dağılımının belirlenmesi, (2) Hidrojel kontakt lens ile silikon hidrojel kontakt lens kullanımının bu türlerin konjonktivadaki dağılımına etkisinin araştırılması, (3) *S. epidermidis* kökenlerinde slime üretiminin Kongo kırmızılı agar (KKA), standart tüp (ST) ve Multipleks Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) yöntemleriyle araştırılarak elde edilen sonuçların karşılaştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi (İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi), Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından (2010-20669) onaylanmıştır.

Örneklerin toplanması: İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalı Kontakt Lens Birimi'ne başvurmuş ve yumuşak kontakt lens kullanmasına karar verilmiş, 88'i kadın 52'si erkek kadınların yaş ortalaması 22 ± 3 , erkeklerin yaş ortalaması 25 ± 3 olan 140 hasta çalışmaya alındı. Bu hastalardan 90'ının hidrojel kontakt lens, 50'sinin ise silikon hidrojel kontakt lens kullanması ve sık değişim programına uygun olarak bu lensleri, 30 gün sonra değiştirmeleri planlandı. Konjonktiva sürüntüleri, lenslerin hastaya ilk defa takılacağı gün, lens takılmadan önce, topikal anestetik madde kullanılmadan, kirpiklere ve göz kapaklarına değdirilmemeye özen gösterilerek, rastgele seçilen yalnızca tek bir gözün alt konjonktival forniksinden üç ayrı steril eküvyonla alındı ve sürüntülerin alındığı göz kaydedildi. Aylık sık değişimli lens kullanım programına tabi olan bu hastalar lenslerini çıkarıp atacakları ve yeni lens alacakları bir aylık dönem sonunda çağrıldı. Kontakt lensleri çıkarılan bu hastaların konjonktiva sürüntüleri, ilk sürüntülerin alındığı aynı gözün konjonktival fornikslerinden, üç ayrı eküvyonla tekrar alındı. Lens kullanım öncesi ve kullanım sonrası dönemde konjonktiva sürüntüleri alınacak olan tüm hastaların konjonktivit veya başka bir göz enfeksiyonu tanısı almamış olmasına ve son 72 saat içinde antibiyotik kullanmamış olmasına dikkat edildi.

Bakterilerin üretilmesi ve tanımlanması: Lens kullanım öncesi ve kullanım sonrası, hasta başında alınan konjonktiva sürüntüleri hiç bekletilmeden Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarları'na getirildi. Sürüntülerin alındığı eküvyonlardan biri ile hazırlanan direkt preparatlar Gram boyası ile boyanarak değerlendirilmiştir. İkinci eküvyon ile %5 koyun kanlı agara ve çukulatamsı agara ekimler yapıldı. Üçüncü eküvyon ise az sayıda bulunabilecek KNS türlerinin çoğalması için tiyoglikolatlı sıvı besiyerine ekildi ve besiyerleri 37°C 'de 24–48 saat inkübe edil-

di. İnkübasyon süresi sonunda öncelikle tiyoglikolatlı sıvı besiyerinden çukulatamsı agara pasajlar alındı ve bu besiyerleri 37°C 'de 24-48 saat inkübe edildi. Tiyoglikolatlı sıvı besiyerinden çukulatamsı agara alınan pasajlarda üreyen KNS türlerinin, %5 koyun kanlı agarda ve çukulatamsı agarda üreyen KNS türlerinden farklı olmadığı gözlemlendi. Her bir konjonktiva sürüntüsünün ekildiği kanlı ve çukulatamsı agarlarda, ayrıca tiyoglikolatlı sıvı besiyerinden pasaj alınan çukulatamsı agarda üreyen farklı morfolojideki koloniler numaralandırıldı ve her birinden Gram preparasyonlar hazırlandı. Gram pozitif diplokok görünümünde olan bakterilere ait benzer morfolojide gözükten kolonilerden katalaz testi yapıldı ve her bir besiyerinden ayrı ayrı katalaz pozitif olan en az 10 koloni pasaj alınarak çoğaltıldı. Çoğaltılan her bir köken için lamda kümeleyici faktör varlığı, DNaz ve tüpte koagülaz enzimi aktivitesi, 0.04 U basitrasin ve $5\ \mu\text{g}$ 'lık novobiosin disklerine olan duyarlılık araştırıldı. Bağlı koagülaz "clumping factor" negatif, tüpte koagülaz enzimi aktivitesi negatif ve basitrasine dirençli olan kökenler KNS olarak isimlendirildi. Tüm KNS kökenlerinin tür tanımı API Staph (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Fransa) kiti ile belirlendi. API Staph kiti ile *S. epidermidis* olduğu belirlenen KNS kökenleri triptik soy agar besiyerine ekilerek 37°C 'de 24-48 saat inkübe edildi ve biyofilm oluşumunda önemli rolü olan *icaA*, *icaD* genlerinin araştırılması aşamasına kadar %10 gliserollü brusella sıvı besiyerinde -70°C 'de saklandı.

***Staphylococcus epidermidis* kökenlerinde slime üretiminin araştırılması:** *S. epidermidis* kökenlerinde slime üretimi, Freeman ve ark.'nın⁽¹³⁾ tanımladığı Kongo Kırmızılı Agar (KKA) ve Christensen ve ark.'nın⁽¹⁴⁾ tanımladığı standart tüp yöntemiyle (ST) araştırıldı. Deneylerde pozitif kontrol olarak slime üreten *S. epidermidis* standart kökeni ATCC 35984 ve negatif kontrol olarak slime üretmeyen *S. epidermidis* standart kökeni ATCC 12228 kullanıldı.

Kongo Kırmızılı Agar (KKA) yöntemi: İzole edilen her bir *S. epidermidis* kökeninin 24 saatlik kültürlerinden KKA besiyerine pasajlar alındı. KKA, laboratuvarımızda Brain Heart Infusion agara (37 g/L, Himedia), sükröz (50 g/L, Merck) ve Kongo kırmızısı (0.8 g/L, Merck) ilave edilerek hazırlandı. KKA besiyerinde

35°C'de 24 saatlik inkübasyon sonunda, pembemsi-kırmızı, düz ve merkezi koyu renkli koloni yapan stafilkok kökenleri slime negatif, siyah, pürüzlü, kuru koloni yapan stafilkok kökenleri ise slime pozitif olarak değerlendirildi⁽¹³⁾.

Standart Tüp (ST) yöntemi: İzole edilen her bir *S. epidermidis* kökeninin 24 saatlik kültürlerinden %0.25 glukozlu trypticase soy buyyon (TSB) içeren tüplere ekimler yapılarak, 0.5 McFarland bulanıklığında bir süspansiyon hazırlandı ve 37°C'de 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonucunda tüplerin içerikleri boşaltıldı ve tüplere 5 ml %25'lik safranin boyası konuldu. Tüpler dikkatlice çalkalanarak boyanın tüm yüzeye teması sağlandı ve iki dakika beklendikten sonra, iki kez PBS ile yıkandı, havada kurutulduktan sonra ters çevrilerek kurutma kağıdı üzerinde beklendi. Tüpün iç çeperinde safranin boyası sayesinde pembe boyanan ince film tabakasının görülmesi, slime üretimi olarak değerlendirildi⁽¹⁴⁾.

Staphylococcus epidermidis kökenlerinden DNA izolasyonu: *S. epidermidis* kökenlerinin DNA izolasyonu için High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Almanya) üretici firmanın önerileri doğrultusunda kullanıldı. DNA izolasyonu yapılacak olan kökenlerin 18-24 saatlik taze pasajlarından alınan koloniler bir ml PBS tamponu ile homojenize edilerek 1 McFarland bulanıklığa göre ayarlandı, süspansiyonlar 11000 rpm'de bir dakika santrifüj edildi. Üst sıvıları atıldıktan sonra kalan pellete, 200 µl Tissue Lysis Buffer ilave edildi. Daha sonra 40 µl Proteinaz K eklenip vorteksenerek örnekler 55°C'de bir saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra sıvılara 200 µl Binding Buffer eklenerek karıştırıldı. Karışım 70°C'de 10 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra örnekler 100 µl isopropanol ilave edildi ve iyice karıştırıldı. Örneklerin sıvı kısımları, koleksiyon tüplerinin üzerine konulan Spin kolonlara steril uçlar ile otomatik pipet yardımıyla aktarıldı. Bir dakika süresince 8000xg'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası, spin kolon yeni bir koleksiyon tüpe aktarıldı ve üzerine 500 µl Inhibitor Removal Buffer ilave edildi. Bir dk süre ile 8000xg'de santrifüj edildi. Santrifüjden sonra spin kolonlar yeni koleksiyon tüplerine alındı ve üzerine 500 µl Wash Buffer ilave

edildi. Bir dk süre ile 8000xg'de santrifüj edildi bu işlem iki kere yapıldı. Spin kolonlar 10 saniye süre ile maksimum hızda (13000xg) tekrar santrifüj edilerek kalan etanol rezidüvleri uçuruldu. Koleksiyon tüpleri atıldı. DNA'yı toplamak amacıyla spin kolonlar temiz, steril, DNaz, RNaz içermeyen, 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı. Önceden 70°C'de ısıtılmış 200 µl Elution Buffer, spin kolonlara ilave edilerek bir dk 8000xg'de santrifüj edildi böylece genomun membrandan ayrılması sağlandı. PZR işlemi yapılmaya kadar örnekler -20°C'de saklandı.

Multipleks PZR ile *icaA* ve *icaD* genlerinin belirlenmesi: Çalışmamızda *icaA* ve *icaD* genlerini araştırmak için Arciola CR ark.'nın⁽¹⁵⁾ belirlemiş olduğu primerler kullanıldı (Tablo 1).

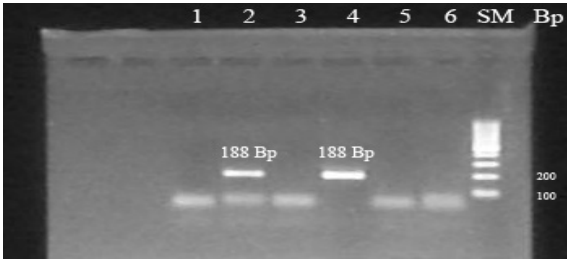
Tablo 1. Multipleks PZR'nda kullanılan primer dizileri ve beklenen bant büyüklükleri.

Gen	Yönü	Dizisi	Ürün boyutu
<i>icaA</i>	düz	5'-TCTCTTGACAGGAGCAATCAA-3'	188 bp
	ters	5'-TCAGGCACTAACATCCAGCA-3'	
<i>icaD</i>	düz	5'-ATGGTCAAGCCAGACAGAG-3'	198 bp
	ters	5'-CGTGTTTTCAACATTTAATGCAA-3'	

İzole edilen DNA'larda *icaA* ve *icaD* genlerinin tespiti tek aşamalı PZR ile araştırıldı. Amplifikasyon, PTC-200 Peltier Thermal Cycler'da gerçekleştirildi (MJ Research, Inc., MA, ABD). Her bir köken için reaksiyon hacminin beş µl'si DNA ekstraktı olmak üzere toplam hacim 50 µl olacak şekilde *icaA* ve *icaD* genleri için ayrı ayrı PZR karışımı hazırlandı. Her bir tüp üzerine birer damla mineral yağı eklendi. Bu işlem

Tablo 2. Multipleks PZR ile *icaA* ve *icaD* genlerinin amplifikasyonu için uygulanan Thermal Cycler programı.

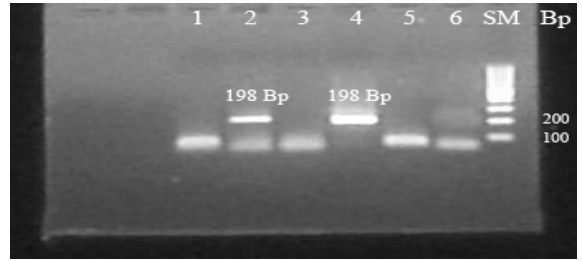
Aşama	Isı / Süre	Tanım
1. Bekleme	94°C / 5 dk	Denatürasyon
2. PZR (50 Döngü)	94°C / 1 dk 53°C / 1 dk 72°C / 1 dk	PZR ile Çoğaltma
3. Bekleme	72°C / 5 dk	Uzaması tamamlanmamış ürünlerin tamamlanması
4. Bekleme	4°C / Sonsuz	Yürütme aşamasına kadar saklamak için



Şekil 1. Multipleks PZR ile saptanan *icaA* geninin agaroz jeldeki görünümü.

(SM: Size marker, 2-4 pozitif örnekler, 1-3-5 negatif örnekler, DNA ladder: 100 kb)

* *icaA* geni için PZR sonrası; 188-bp'de bantlar izlendi.



Şekil 2. Multipleks PZR ile saptanan *icaD* geninin agaroz jeldeki görünümü

(SM: Size marker, 2-4 pozitif örnekler, 1-3-5 negatif örnekler, DNA ladder: 100 kb)

* *icaD* geni için PZR sonrası; 198-bp'de bantlar izlendi.

sonrasında tüplerin kapağı kapatılarak örnekler Thermal Cycler'a yerleştirildi ve Tablo 2'de belirtilen PZR programı uygulandı.

Amplifikasyon sonrası PZR ürünleri yatay agaroz jel elektroforezi ile incelendi. Bu amaçla her yürütülen ürün grubunda elde edilen bantların büyüklüğünü karşılaştırmak için 100 bp'lik (bp: base pair (baz çifti)) size marker (Fermentas®, Litvanya) kullanıldı. 100 V'da 20-25 dakika (Minnie.The.Gel.CicleHE 33, Hoefer Scientific Instruments, San Fransisco, ABD) yürütüldükten sonra UV - translüminatör (Model Tuv 20 Owl Scientific, ABD) altında incelendi ve araştırılan bantlar değerlendirilerek pozitif örneklerin fotoğrafları çekildi (Kodak 1D 3.5) (Şekil 1, 2).

İstatistik analiz: Sonuçların istatistiksel olarak değerlendirilmesinde Mc Nemar testi kullanılmıştır. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

BULGULAR

Kullanılan kontakt lens türüne bakılmaksızın, kontakt lens kullanan toplam 140 hastamızın, lens kullanmaya başlamadan önce alınan konjonktiva sürüntülerinden 81 (%57.8) KNS kökeni üretilmiştir. KNS'lardan *S. epidermidis* %88.9 oranıyla en sık izole edilen tür olmuştur. Diğer KNS türleri sırasıyla yedi (%8.65) *Staphylococcus lugdunensis*, iki (%2.45) *Staphylococcus capitis* olarak tanımlanmıştır. Buna karşın kontakt lens kullanım sonrası toplam 140 hastamızın konjonktiva sürüntülerinden 109 (%77.8) KNS kökeni üretilmiştir. Çalışmada her hasta için lens kullanım sonrası üretilen KNS türlerinin lens kullanım

öncesi üretilen türlerle benzerliği moleküler yöntemlerle araştırılmaksızın lens kullanımına bağlı olarak konjonktiva mikrobiyotasında *icaA* ve *icaD* genlerine sahip *S. epidermidis* ve diğer KNS türlerinin dağılımında bir değişiklik olup olmadığı araştırılmış ve lens kullanım sonrası üretilen KNS türlerinin 89'u (%81.6) *S. epidermidis*, 15'i (%13.76) *S. lugdunensis*, üçü (%2.75) *Staphylococcus caprae* ve ikisi *S. capitis* olarak tanımlanmıştır. Konjonktivit veya başka bir göz enfeksiyonu tanısı olmayan bu hastalarda üretilen KNS'lar konjonktiva mikrobiyotasına ait bakteriler olarak kabul edilmiştir.

Üreyen KNS türlerinin hidrojel kontakt lens ve silikon hidrojel kontakt lens kullanım sonrası konjonktivadaki dağılımları incelendiğinde, hidrojel kontakt lens kullanan 90 hastanın lens kullanım öncesi 51'inde (%56.67), lens kullanım sonrası ise 67'sinde (%74.4) KNS üretilmiştir. Bu stafilokokların lens kullanım öncesi ve kullanım sonrası türlere göre dağılımı Tablo 3'te gösterilmiştir.

Hidrojel kontakt lens kullanmış olan hastalardan izole edilen toplam KNS türlerinin dağılımı lens kullanım öncesi belirlenen dağılım ile kıyaslandığında her iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadığı belirlenmiştir ($p > 0.05$). İzole edilen her bir stafilokok türünün gruplar arasında ayrı ayrı dağılımı bakımından da istatistiksel bir fark bulunmadığı saptanmıştır ($p > 0.05$) (Tablo 3).

Silikon hidrojel kontakt lens kullanan 50 hastanın lens kullanım öncesi 30'unda (%60), kullanım sonrası ise 42'sinde (%84) KNS üretilmiştir. Bu stafilokokların

Tablo 3. Kontakt lens kullanım öncesi ve kullanım sonrası hastaların konjonktiva sürüntülerinden izole edilen KNS türlerinin dağılımı [n (%)].

Üreyen KNS türleri (n)	Hidrojel kontakt lens kullanan hastalar n=90			Silikon hidrojel kontakt lens kullanan hastalar n=50		
	Kullanım öncesi n (%)	Kullanım sonrası n (%)	P	Kullanım öncesi n (%)	Kullanım sonrası n (%)	P
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (161)	44 (48.8)	52 (57.7)	p>0.05	28 (56)	37 (74)	p>0.05
<i>Staphylococcus lugdunensis</i> (22)	5 (5.6)	10 (11.1)	p>0.05	2 (4)	5 (10)	p>0.05
<i>Staphylococcus caprae</i> (3)	(-)	3 (3.3)	p>0.05	(-)	(-)	p>0.05
<i>Staphylococcus capitis</i> (4)	2 (2.2)	2 (2.2)	p>0.05	(-)	(-)	p>0.05
Toplam (190)	51 (56.7)	67 (74.4)		30 (60)	42 (84)	

Tablo 4. Kontakt lens kullanım öncesi ve kullanım sonrası hastaların konjonktiva sürüntülerinde saptanan *icaA* ve *icaD* pozitif *Staphylococcus epidermidis* kökenlerinin dağılımı [n (%)].

Kontakt lens türü	Lens kullanımı	Üreyen toplam <i>Staphylococcus epidermidis</i> n (%)	<i>icaA</i> (+) <i>icaD</i> (+) <i>Staphylococcus epidermidis</i> n (%)
Hidrojel kontakt lens kullanan hastaların konjonktiva mikrobiyotası (n=90)	Lens kullanım öncesi	44 (48.8)	20 (45.0)
	Lens kullanım sonrası	52 (57.7)	31 (59.0)*
Silikon hidrojel kontakt lens kullanan hastaların konjonktiva mikrobiyotası (n=50)	Lens kullanım öncesi	28 (56.0)	14 (50.0)
	Lens kullanım sonrası	37 (74.0)	26 (70.2)*

*: p<0.05

lens kullanım öncesi ve kullanım sonrası türlere göre dağılımı Tablo 3'te gösterilmiştir. Silikon hidrojel kontakt lens kullanım sonrası izole edilen toplam KNS türlerinin dağılımı lens kullanım öncesi belirlenen dağılım ile kıyaslandığında her iki grup arasında istatistiksel bir fark bulunmadığı belirlenmiştir (p>0.05). İzole edilen her bir stafilkok türünün gruplar arasında ayrı ayrı dağılımı bakımından da istatistiksel bir fark bulunmadığı saptanmıştır (p>0.05) (Tablo 3).

Hidrojel ve silikon hidrojel kontakt lens kullanım öncesi ve sonrası konjonktiva mikrobiyotasında *icaA* ve *icaD* pozitif *S. epidermidis* kökenlerinin dağılımları Tablo 4'te gösterilmiştir. Hidrojel kontakt lens kullanım sonrası tespit edilen *icaA*(+) ve *icaD*(+) *S. epidermidis* kökeni sayısının, lens kullanım öncesine göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu belirlenmiştir (p<0.05) (Tablo 4). Bunun yanı sıra, silikon hidrojel kontakt lens kullanım sonrası tespit edilen *icaA*(+) ve *icaD*(+) *S. epidermidis* kökeni sayısının, lens kullanım öncesine göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu belirlenmiştir (p<0.05) (Tablo 4).

Tablo 5. Slime üretimi tespitinde Kongo Kırmızılı agar, standart tüp ve multipleks PZR yöntemleriyle elde edilen sonuçların karşılaştırılması [n (%)].

Yöntem	Pozitif n(%)
Kongo Kırmızılı Agar	82 (50.9)
Standart Tüp	61 (37.8)
Multipleks PZR	91 (56.5)

Gerek silikon hidrojel kontakt lens kullanan gerekse hidrojel kontakt lens kullanan hastaların lens kullanım öncesi ve sonrası, konjonktiva sürüntülerinden toplam 161 *S. epidermidis* kökeni üretilmiştir. Slime üretiminin saptanmasında kullanılan üç farklı yöntemle elde edilen sonuçlar Tablo 5'de verilmiştir.

TARTIŞMA

Son yıllarda gerek görme gücünü artırma, gerekse estetik görünüm sağlamak amacıyla kontakt lens kullanımının hızla arttığı görülmektedir. Ancak kontakt lens kullanımının normal konjonktiva mikrobiyotasındaki KNS'lar gibi bakterileri etkilediği ve lens kullanımına bağlı olarak mikrobiyotada değişimler oluşturabileceği, hatta daha da ileri giderek başta konjonktivit ve bakteriyel keratit olmak üzere enfek-

siyonlar gelişebileceği gösterilmiştir^(1,16,17).

Konjonktival mikrobiyota doğumdan itibaren gelişen ve yaşam boyu devam eden bir mikroorganizma birlikteliğinden oluşmaktadır. Konjonktiva bazı bireylerde yaşamın belirli bir döneminde özellikle genç yaşta steril kalabilse de, çevreye, yaşa, mevsime, vücut direncine, kontakt lens kullanımına ve diğer faktörlere bağlı olarak değişiklik gösterebilen bir mikrobiyota ile kaplanır. KNS'lar konjonktival mikrobiyotadan en çok izole edilen bakteriler olmakla beraber, *S. epidermidis*'in en yoğun kolonize olan bakteri olduğu bilinmektedir⁽³⁾.

Ulusal çalışmalar incelendiğinde; Erdoğan ve ark.⁽¹⁸⁾ sık değişimli yumuşak kontakt lenslerin günlük kullanımından sonra hastaların konjonktiva mikrobiyotasından %30 oranında *S. epidermidis* üretmişlerdir. İskeleli ve ark.⁽¹⁹⁾ yumuşak hidrojel kontakt lens kullanımından sonra %49.3 oranında KNS üretmişlerdir. Uluslararası çalışmalar incelendiğinde ise Rahim ve ark.⁽²⁰⁾ yumuşak kontakt lens kullanan 100 hastanın %65'inde lenslerin kontamine olduğunu göstermişlerdir. Lens kullanım sonrası konjonktival mikrobiyotadan %40.6 oranında *S. epidermidis* üretmişlerdir. Willcox ve ark.⁽²¹⁾ yumuşak lenslerde aerop bakterilerden KNS'ların %39.9 ile en sık rastlanan kontaminant olduğunu göstermişlerdir. Çalışmamızda hidrojel kontakt lens kullanan hastalarda lens kullanım sonrası izole edilen mikroorganizmalar başta 52 (%57.7) *S. epidermidis* olmak üzere, 10 (%11.1) *S. lugdunensis*, üç (%3.3) *S. caprae* ve iki (%2.2) *S. capitis* ve silikon hidrojel kontakt lens kullanan hastalarda 37 (%74.0) *S. epidermidis*, beş (%1.0) *S. lugdunensis*'tir.

Son yıllarda giderek artan bir şekilde KNS'lar enfeksiyon gelişiminde önemli bir klinik etken olarak bildirilmektedir. Yapılan hayvan modellenli çalışmalar biyofilm üreten *S. epidermidis* kökenlerinin biyofilm üretmeyen kökenlere göre daha virülan olduğunu göstermiştir^(22,23). *S. epidermidis* kökenlerinde hücre içi adezyon moleküllerini kodlayan genlerin varlığının slime üretimi ve biyofilm oluşumu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir⁽²⁴⁾. Slime üretimi, mikroorganizmaların konak hücreye ve yapay yüzeylere adezyonundan

sorumludur^(14,25). Slime üreten kökenler sağlıklı korneayı bile enfekte edebilmektedir⁽²⁶⁾. Normal konjonktival mikrobiyotada sıklıkla bulunan gram pozitif bakterilerden *S. epidermidis*'in slime üretimi en önemli virülans faktörüdür^(14,25). Uluslararası çalışmalar incelendiğinde; Suzuki ve ark.'nın⁽²⁷⁾ sağlıklı insanların konjonktival mikrobiyotalarında *S. epidermidis*'lerin slime üretimini Kongo kırmızılı agar ve PZR yöntemiyle inceledikleri çalışmalarında %60'ının *icaA* geni taşıdığını belirlemişlerdir. Yaptıkları araştırmanın sonucu olarak, slime üreten *S. epidermidis*'lerin oküler enfeksiyonlarda önemi olabileceğini belirtmişlerdir. Catalanotti ve ark.⁽²⁸⁾ ise bakteriyel bilateral konjonktiviti olan ve yumuşak kontakt lens kullanan 97 hastanın konjonktival sürüntü örneklerinde yaptıkları bir çalışmada, izole edilen *S. epidermidis* kökenlerinin %74.1'nin *icaA* ve *icaD* genlerine sahip olduklarını bildirirken, Murugan ve ark.⁽²⁹⁾ konjonktiviti hastalardan ürettikleri *S. epidermidis*'lerde *icaA* taşıma oranını %66.7 bulmuşlardır. Konjonktiva mikrobiyotasında slime üreten *S. epidermidis* kökenlerinin bulunması, kontakt lens kullanacak olan hastalar için önemli bir veridir. Çalışmamızda hidrojel kontakt lens kullanım öncesi slime pozitif *S. epidermidis* oranı %45.0 iken lens kullanım sonrası %59.0'a, silikon hidrojel kontakt lens kullanım öncesi slime pozitif *S. epidermidis* oranı %50.0 iken lens kullanım sonrası %70.2'ye yükselmiştir. Lens kullanım öncesi oranlarımız Suzuki ve ark.'nın⁽²⁷⁾ sağlıklı insanların konjonktival mikrobiyotasında %60'luk *icaA*(+) ve *icaD*(+) oranlarından az olmakla birlikte, lens kullanım öncesi ve sonrasını inceleyen bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızın önemli bir kısıtlılığı lens kullanım sonrası izole ettiğimiz KNS türlerinin lens kullanım öncesi üretilen türlerle benzerliğinin moleküler yöntemlerle araştırılmamış olmasıdır. Lens kullanım öncesi ve sonrası moleküler olarak benzerlik gösterilen türlerin miktarlarındaki değişiklikler gösterilebilseydi çok daha kapsamlı veriler elde edilmiş olurdu.

Slime üretimini araştırmak amacıyla genellikle kongo kırmızılı agar, standart tüp, mikroplyet ve moleküler yöntemler kullanılmaktadır. Araştırmamızda 161 *S. epidermidis* kökeninde slime üretimi kongo kırmızı-

lı agar yöntemi ile %50.9, standart tüp yöntemi ile %37.8, PZR yöntemi ile de %56.5 olarak tespit edilmiştir. Çalışmamızda kullandığımız kongo kırmızılı besiyeri ile moleküler yöntemler arasında uyumlu sonuçlar elde edilmiştir. *icaA* ve *icaD* geni taşıyan bütün kökenler kongo kırmızılı agarda siyah koloni oluşturmuşlardır. Ancak moleküler yöntemler ile diğer yöntemlerin arasında tespit ettiğimiz fark, bu genlere sahip her bakteride fenotipik olarak slime özelliğinin görülemeyebileceğini göstermektedir. Standart tüp yöntemindeki oranın diğer yöntemlere oranla daha düşük bulunmasını, değerlendirmenin gözle yapılışından dolayı zayıf pozitif kökenlerin negatif olarak değerlendirilmesi nedeniyle olabileceği kanaatindeyiz. Sonuçlar arasındaki uyum ulusal ve uluslararası verilerle desteklenmektedir^(14,28,29).

Çalışmamız sonucunda; slime üreten *S. epidermidis* kökenlerinin saptanmasında, Multipleks PZR ve KKA yönteminin, ST yöntemine göre daha güvenilir olduğu anlaşılmıştır. Mikrobiyal keratit gelişmesinde hazırlayıcı faktörlerden biri olduğu kabul edilen kontakt lens kullanımının, konjonktiva mikrobiyotasında bulunan KNS türlerinin dağılımında anlamlı bir değişime neden olmadığı ancak gerek hidrojel kontakt lens gerekse silikon hidrojel kontakt lens kullanımının konjonktiva mikrobiyotasında bulunan *icaA* ve *icaD* pozitif *S. epidermidis* kökenlerinin miktarında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artışa neden olduğu belirlenmiştir.

Etik Kurul Onayı: Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi (İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi), Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından (2010-20669) onaylanmıştır.

Çıkar Çatışması: Yazarlar arasında çıkar çatışması bulunmamaktadır.

Finansal Destek: İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi) tarafından desteklenmiştir (Proje No: 7346).

Ethics Committee Approval: It was approved by the Istanbul University-Cerrahpaşa Faculty of Medicine (Istanbul University, Cerrahpaşa Faculty of Medicine),

Clinical Research Ethics Committee (2010-20669).

Conflict of Interest: There is no conflict of interest between the authors.

Funding: Research Fund of Istanbul University-Cerrahpaşa (Research Fund of Istanbul University). Project No: 7346.

KAYNAKLAR

1. Birinci H, Birinci A, Şahin M, Öge F, Öge İ. Konjonktival floranın insülin kullanan diabetik hastalar ile kontrollerde karşılaştırılması. Turk Oftalmol Derg. 1998;28: 144-6.
2. Stroman DW, Bartell JG, Schleich BA. Evidence for *Propionibacterium acnes* as a conjunctival pathogen. 41st Annual Meeting 2007 Ocular Microbiology and Immunology Group (OMIG), 9 November 2007, New Orleans, Louisiana; 2007:A8.
3. Yıldırım N, Akgün Y, Topbaş S, Başmak H, Kiraz N, Yurdakul S. Çeşitli göz enfeksiyonlarında konjonktiva kültürlerinin değerlendirilmesi. Mikrobiyol Bul. 1990;24:71-8.
4. Osato MS. Normal ocular flora. In: Pepose JS, Holland GN, Wilhelmus KR (Eds.) Ocular infection and immunity. St.Louis: Mosby, 1996:191-9.
5. Leonhardt A, Renvert S, Dahlen G. Microbial findings at failing implants. Clin Oral Implants Res. 1999;10(5):339-45. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0501.1999.100501.x>
6. Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces. Emerg Infect Dis. 2002;8(9):881-90. <https://doi.org/10.3201/eid0809.020063>
7. Sankaridurg PR, Markoulli M, Jara PL, et al. Lid and conjunctival micro biota during contact lens wear in children. Optom Vis Sci. 2009;86(4):312-7. <https://doi.org/10.1097/OPX.0b013e318199d20c>
8. Patti JM, Allen BL, McGavin MJ, Höök M. MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. Annu Rev Microbiol. 1994;48:585-617. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.48.100194.003101>
9. Pastewski BM, Lee AM. Contact Lens Care (Part 1). Am Drug. 1985;192(11):117-39.
10. Engle JP. Contact Lens Care. Am Drug. 1990;201(1):54-65.
11. TC. Sağlık Bakanlığı. Sağlık İstatistikleri Yıllığı 2018. Ankara, 2019. [<https://dosyasb.saglik.gov.tr/Eklenti/36134,siy2018trpdf.pdf?0>] (Erişim tarihi: Mayıs.2021)
12. Göğüş MU. Mikrobiyal keratitli hastalarda epidemiyolojik, laboratuvar ve klinik sonuçlar [Tıpta uzmanlık tezi]. İzmir: Dokuz Eylül Üniversitesi, 2013.
13. Freeman DJ, Falkiner FR, Keane CT. New method for

- detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *J Clin Pathol.* 1989 Aug;42(8):872-4.
<https://doi.org/10.1136/jcp.42.8.872>
14. Christensen GD, Simpson WA, Bisno AL, Beachey EH. Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infect Immun.* 1982;37(1):318-26.
<https://doi.org/10.1128/iai.37.1.318-326.1982>
 15. 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(6):2151-6.
<https://doi.org/10.1128/JCM.39.6.2151-2156.2001>
 16. Birinci H, Birinci A, Acar O, Öge İ, Günaydin M. Hemodiyaliz hastalarında konjonktival flora. *Türkiye Klinikleri J Ophthalmol.* 1998;7(4):262-5.
 17. Iskeleli G, Bahar H, Unal M, Artunay O, Akova N, Torun MM. Microbiologic evaluation of frequent-replacement soft contact lenses. *CLAO J.* 2002;28(4):192-5.
<https://doi.org/10.1097/01.ICL.0000024118.45191.9B>
 18. Erdoğan H, Kemal M, Toker MI, Topalkara A, Bakici Z. Effect of frequent-replacement contact lenses on normal conjunctival flora. *CLAO J.* 2002;28(2):94-5.
 19. Iskeleli G, Bahar H, Eroglu E, Torun MM, Ozkan S. Microbial changes in conjunctival flora with 30-day continuous-wear silicone hydrogel contact lenses. *Eye Contact Lens.* 2005;31(3):124-6.
<https://doi.org/10.1097/01.ICL.0000141923.63458.DF>
 20. Rahim N, Bano H, Naqvi BS. Bacterial contamination among soft contact lens wearer. *Pakistan J Ophthalmol.* 2008;24(2):93-6.
 21. Willcox MD, Power KN, Stapleton F, Leitch C, Harmis N, Sweeney DF. Potential sources of bacteria that are isolated from contact lenses during wear. *Optom Vis Sci.* 1997;74(12):1030-8.
<https://doi.org/10.1097/00006324-199712000-00025>
 22. Deighton MA, Borland R, Capstick JA. Virulence of *Staphylococcus epidermidis* in a mouse model: significance of extracellular slime. *Epidemiol Infect.* 1996;117(2):267-80.
<https://doi.org/10.1017/S0950268800001448>
 23. Gelosia A, Baldassarri L, Deighton M, van Nguyen T. Phenotypic and genotypic markers of *Staphylococcus epidermidis* virulence. *Clin Microbiol Infect.* 2001;7(4):193-9.
<https://doi.org/10.1046/j.1469-0691.2001.00214.x>
 24. Ammendolia MG, Di Rosa R, Montanaro L, Aricola CR, Baldassarri L. Slime production and expression of the slime-associated antigen by staphylococcal clinical isolates. *J Clin Microbiol.* 1999;37(10):3235-8.
<https://doi.org/10.1128/JCM.37.10.3235-3238.1999>
 25. Blot F, Nitenberg G, Chachaty E, et al. Diagnosis of catheter-related bacteraemia: a prospective comparison of the time to positivity of hub-blood versus peripheral - blood cultures. *Lancet.* 1999;354(9184):1071-7.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(98\)11134-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(98)11134-0)
 26. Garcia-Saenz MC, Arias-Puente A, Fresnadillo-Martinez MJ, Paredes-Garcia B. Adherence of two strains of *Staphylococcus epidermidis* to contact lenses. *Cornea.* 2002;21(5):511-5.
<https://doi.org/10.1097/00003226-200207000-00014>
 27. Suzuki T, Kawamura Y, Uno T, Ohashi Y, Ezaki T. Prevalence of *Staphylococcus epidermidis* strains with biofilm-forming ability in isolates from conjunctiva and facial skin. *Am J Ophthalmol.* 2005;140(5):844-50.
<https://doi.org/10.1016/j.ajo.2005.05.050>
 28. Catalanotti P, Lanza M, Del Prete A, et al. Slime-producing *Staphylococcus epidermidis* and *S. aureus* in acute bacterial conjunctivitis in soft contact lens wearers. *New Microbiol.* 2005;28(4):345-54.
 29. Murugan K, Usha M, Malathi P, Saleh Al-Sohaibani A, Chandrasekaran M. Biofilm forming multi drug resistant *Staphylococcus* spp. among patients with conjunctivitis. *Pol J Microbiol.* 2010;59(4):233-9.
<https://doi.org/10.33073/pjm-2010-036>