

BİYOFİLM OLUŞTURAN VE OLUŞTURMAYAN *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* KLİNİK İZOLATLARININ HİDROFOBİK ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI*

INVESTIGATION OF HYDROPHOBIC CHARACTERISTICS OF BIOFILM PRODUCER AND NON-PRODUCER *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* CLINICAL ISOLATES

Selma AY¹, Tayfun GÜLDÜR², Mehmet Sait TEKEREKOĞLU¹, Barış OTLU¹

¹ İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Malatya. (say@inonu.edu.tr)

² İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Malatya.

ÖZET

Stafilokok enfeksiyonlarının patogeneğinde, stafilokokların yabancı cisim yüzeylerine yapışma ve bu yüzeylerde biyofilm (slime) oluşturma yetenekleri rol oynamaktadır. Yüzeye bağlanmada mikroorganizma ile yüzey arasındaki hidrofobik etkileşimler ve hidrojen bağları da önemlidir. Bu çalışmada, biyofilm oluşturan ve oluşturmeyan *Staphylococcus aureus* klinik izolatlarının hidrofobik özelliklerinin araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya, Mayıs 2006-Haziran 2007 tarihleri arasında yoğun bakım ünitesinde yatmakta olan hastaların kan kültürlerinden izole edilen, tümü metisiline dirençli ve 5'i biyofilm oluşturan 10 *S.aureus* suşu dahil edilmiştir. Çalışmada standart suş olarak *S.aureus* ATCC 25923 kullanılmış; "slime" üretimi Christensen yöntemi ile, metisilin direnci sefoksitin disk difüzyon ve oksasilin tuz agar tarama testi ile belirlenmiş ve suşların hiçbirinin otoagregasyon göstermediği saptanmıştır. İzolatların hidrofobik yüzeylere yapışma özelliği, hidrofobik etkileşim kromatografisi (HIC; Hydrophobic Interaction Chromatography) ile araştırılmış ve HIC yönteminde katı faz olarak üç farklı hidrokarbon (bütil-sefaro, oktil-sefaro ve fenil-sefaro; Amersham Bioscience, İsveç) kullanılmıştır. Çalışmamızda, biyofilm oluşturan izolatların bütil- ve oktil-sefaro ile kromatografisi sonunda iki fraksiyona (sırasıyla; %40 ve %96 etanol); oluşturmeyan suşların ise üç fraksiyona [sırasıyla; fosfat tamponu (PBS), %40 ve %96 etanol] ayrıldığı saptanmıştır. Buna karşın "slime" pozitif ve negatif *S.aureus* suşlarının fenil-sefaro kromatografisi sonunda iki fraksiyon (sırasıyla; %40 ve %96 etanol) elde edilmiştir. Hidrofobite çalışmalarında, ortamın pH ve ısı değişimlerinin sonuçlar üzerindeki etkisinin araştırılması amacıyla da, tüm işlemler 4°C'de ve pH 6-9 arası değerlerde tekrarlanmış ve bu ısı ve pH değerlerinde kromatografik paternlerin değişmediği görülmüştür. Sonuç olarak, biyofilm oluşturan *S.aureus* izolatlarının, oluşturmeyan izolatlara göre daha hidrofobik olduğu belirlenmiştir. Ayrıca verilerimiz, saf *S.aureus* kültürleri içerisinde dahi farklı hidrofobik bağlanma kuvvetine sahip heterojen fraksiyonlar bulunabileceğini ve bu heterojen fraksiyonlar arasında hidrofobik yüzey proteinlerinin salgılanma derecelerinin farklı olabileceğini düşündürmüştür. Ancak, fark-

* Bu çalışma, Malatya İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (BAP 2004/83) tarafından desteklenmiştir.

lı fraksiyonlarda yer alan suşların daha iyi karakterize edilmesi ve enfeksiyon oluşturma yeteneklerinin ortaya konması için ileri çalışmalara gereksinim vardır.

Anahtar sözcükler: *Staphylococcus aureus*, biyofilm, slime, hidrofobisite, kromatografi.

ABSTRACT

The ability of staphylococcus to adhere certain structures and to form biofilm (slime) layer plays an important role in the pathogenesis of staphylococcal infections. Hydrophobic interactions and hydrogen bonds are important factors that play role in adherence. This study was designed to compare the hydrophobic properties of slime positive and negative *Staphylococcus aureus* strains isolated from blood cultures. Ten methicillin-resistant *S.aureus* isolates (five of them being slime positive) obtained from blood cultures of patients at intensive care unit of a university hospital, between May 2006 and June 2007, were included in the study. Slime production of the isolates was determined by Christensen's method. Methicillin resistance was determined by cefoxitin disc test and oxacillin salt agar test. It was determined that the test strains did not exhibit any autoaggregation. The adherence of strains to the three different hydrocarbons as solid phases (butyl-sepharose, octyl-sepharose and phenyl-sepharose; Amersham Bioscience, Sweden) were studied by using hydrophobic interaction chromatography (HIC) method. After butyl- and octyl-sepharose chromatography, it was determined that slime negative *S.aureus* strains were separated into three fractions eluted with phosphate buffered saline (PBS), 40% and 96% ethanol, while slime positive strains were separated into two fractions eluted with 40% and 96% ethanol, respectively. By phenyl-sepharose chromatography analysis; both slime negative and positive strains were separated into two fractions eluted in 40% and 96% ethanol. Hydrophobicity tests were repeated at 4°C and pH 6-9 to evaluate the effect of changing conditions on hydrophobicity. However, no changes were observed at these temperature and pH values. According to these analysis it was concluded that; (a) *S.aureus* strains consist heterogeneous fractions with distinct hydrophobic binding strengths; (b) hydrophobic surface protein secretion may be different in heterogeneous groups, and (c) slime positive *S.aureus* strains were more hydrophobic than non-slime producing strains. Further research is required in order to characterise the eluted fractions and to evaluate their pathogenic capacities.

Key words: *Staphylococcus aureus*, biofilm, slime, hydrophobicity, chromatography.

GİRİŞ

Polar özellik taşımayan moleküllerin sıvı ortamda kendiliğinden bir araya gelme eğilimi, hidrofobik etkileşim olarak isimlendirilmektedir. Bu etkileşimin arkasındaki itici güç, hidrofobik grupların etrafını çevreleyen su moleküllerinin yer değiştirmesinden kaynaklanan entropi artışıdır. Hidrofobik etkileşimlerin biyolojik sistemlerdeki en büyük önemi, mikroorganizmaların yüzeylere tutunmasını ve burada çoğalıp enfeksiyonlara neden olmasını kolaylaştırmasıdır¹⁻⁷. Stafilokok enfeksiyonlarının patogeneğinde de, yabancı cisimlerin yüzeylerine yapışma ve bu yüzeylerde biyofilm (slime) oluşturma yetenekleri rol oynamaktadır. Yüzeye bağlanmada mikroorganizma ile yüzey arasındaki hidrofobik etkileşimler ve hidrojen bağları etkilidir. Hastane enfeksiyonları yönünden patojen mikroorganizmanın, vücut içine yerleştirilen cihazlara yapışması ilk aşamayı oluşturmaktadır.

Çeşitli mikroorganizmaların hidrofobik yüzeylere bağlanma dereceleri çeşitli yöntemlerle araştırılmıştır⁷⁻¹⁰. Bu yöntemlerden birisi olan hidrofobik etkileşim kromatografisi (HIC; Hydrophobic Interaction Chromatography), hareketli bir taşıyıcı faz ile hareketsiz

bir sabit faz arasında, karışım bileşenlerinin hidrofobik etkileşim derecelerine göre ayrılması temeline dayanır. Bu işlemde; bakteri süspansiyonu (hareketli faz), hidrofobik bir ortamdan (sabit faz) geçirilmekte, bakteri süspansiyonu içinde hidrofobisite dereceleri açısından farklılık gösteren elemanlar kolonu farklı zamanlarda terk etmektedir. Bu şekilde sabit fazdan çıkan bileşenler uygun bir biçimde birbirinden ayrılabilir¹¹⁻¹⁴. Yapılan çalışmalar, çoğunlukla *Staphylococcus epidermidis*'in biyofilm oluşturması ve hidrofobik özellikleri ile ilişkili iken; *Staphylococcus aureus* ile bu konuda yapılan çalışmalar daha az sayıdadır^{2,5,6,8,10}. Hastane enfeksiyonu etkenleri arasında ilk sıralarda yer alan *S.aureus* suşlarında, farklı hidrofobik yüzeylere bağlanma açısından heterojen grupların mevcut olup olmadığı ve HIC paternleri henüz tam olarak bilinmemektedir. Bu çalışmada, biyofilm oluşturan ve oluşturmayan *S.aureus* klinik izolatlarının hidrofobik özelliklerinin HIC yöntemiyle belirlenmesi ve hidrofobisite çalışmalarında ortamın pH ve ısı değişimlerinin etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Mayıs 2006-Haziran 2007 tarihleri arasında İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezi Mikrobiyoloji Laboratuvarında gerçekleştirilen bu çalışmaya, yoğun bakım ünitesinde yatmakta olan hastaların kan kültürlerinden patojen etken olarak izole edilen 10 *S.aureus* suşu dahil edildi. İzolatlar, mannitol tuzlu agarda üreme, koloni görünüşleri, Gram boyama, koagülaz ve "clumping factor" oluşturma özelliklerine göre^{1,3} ve API Staph Reagent Kit (BioMerieux, Fransa) yardımı ile tanımlandı. Metisilin direnci "Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)" önerileri doğrultusunda, sefoksitin disk difüzyon testi ve oksasilin agar tarama testi ile belirlendi¹⁵. İzolatlar çalışılncaya kadar %20 gliserin içeren beyin-kalp infüzyon (BHI) besiyerinde ve -70°C'de saklandı. Kontrol suşu olarak *S.aureus* ATCC 25923 kullanıldı.

Suşlarda biyofilm oluşumu Christensen yöntemi ile belirlendi¹⁶. Kanlı agarda üreyen kolonilerden bir öze dolusu alınarak, içinde 5 ml triptik soy buyyon (Fluka BioChemika, Almanya) bulunan cam tüp içine aktarıldı ve 37°C'de 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda tüp içeriği yavaşça boşaltıldı ve %0.25'lik safranin-O solüsyonu (Merck, Almanya) ile boyandı. Biyofilm saptanmaması "slime" negatif olarak kabul edildi¹⁶.

Örneklerin kendiliğinden kümeleşme (autoaggregation) gösterip göstermediklerini belirlemek için; taze bakteri kolonisinden alınan bir öze dolusu örnek fosfat tamponlu solüsyon (0.1 M PBS, pH 7.5) ile lam üzerinde ve oda ısısında karıştırıldı, bir dakika içinde aglutinasyon meydana gelip gelmediği değerlendirildi.

Çalışmada, standart suş olarak kullanılan *S.aureus* ATCC 25923, adi agar besiyerine ekilerek (Biolife, İtalya) 37°C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda bol miktarda bakteri alınarak PBS içinde 5000xg'de 3 kez 10'ar dakika yıkandı¹⁷. Yıkama sonunda örneklerin 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5 ve 4 McFarland bulanıklık ayarları BD BLL CrystalSpec nefelometre (Becton Dickinson, ABD) ile yapıldı. Hazırlanan süspansiyonların absorbanları 492 nm'de (MiniLyser, Tekan) ölçüldü ve McFarland bulanıklığına karşı absorban grafikleri çizildi. Çizilen bu grafikten, izolatların McFarland ayarları yapılrken faydalanıldı. Hidrofobik özellikleri araştırılacak örnekler optik dansitesi (OD) 492

nm'de 0.5-1.0 olacak şekilde PBS içinde sulandırıldı¹⁸. Kolonda kalabilecek olan bakterilerin süzüntüye geçmesini sağlamak için öncelikle etil alkolün değişik sulandırmaları ile denemeler yapıldı. Kolondan bakteriyi ayırmak için etil alkolün %40 ve %96'lık solüsyonları ile en iyi sonucun alındığı belirlendi ve çalışmada bu sulandırmalar kullanıldı.

HIC yönteminde katı faz olarak üç farklı hidrokarbon (bütil-sefaroze, oktil-sefaroze ve fenil-sefaroze; Amersham Bioscience, İsveç) kullanıldı. Hazırlanan her bir bakteri süspansiyonundan 1.5 ml (ortalama 1500×10^6 bakteri/ml) alınarak kolondan geçirildi. Bakteri süspansiyonunun ardından kolondan sırasıyla, steril PBS, %40'lık etil alkol ve %96'lık etil alkol geçirildi (akım hızı 1 ml/dakika olarak ayarlandı). Süzüntü, mikroplaklardaki kuyucuklar içinde toplandı ve 492 nm dalga boyunda OD'leri ölçüldü (Amersham Pharmacia Biotech, İsveç).

Isı ve pH değişimlerinin kromatografi sonucunu etkileyebileceği göz önüne alınarak, tüm işlemler 4°C'de ve pH 6-9 arası değerlerde tekrarlandı.

BULGULAR

Çalışmamızda, 10 *S.aureus* klinik izolatının 5'inin biyofilm oluşturduğu ve tümünün metisiline dirençli olduğu belirlenmiş; klinik izolatların ve kontrol suşunun otoagregasyon göstermediği saptanmıştır. HIC yöntemi ile biyofilm oluşturan ve oluşturmayan *S.aureus* suşlarının elüsyon profilleri Şekil 1-3'te gösterilmiştir.

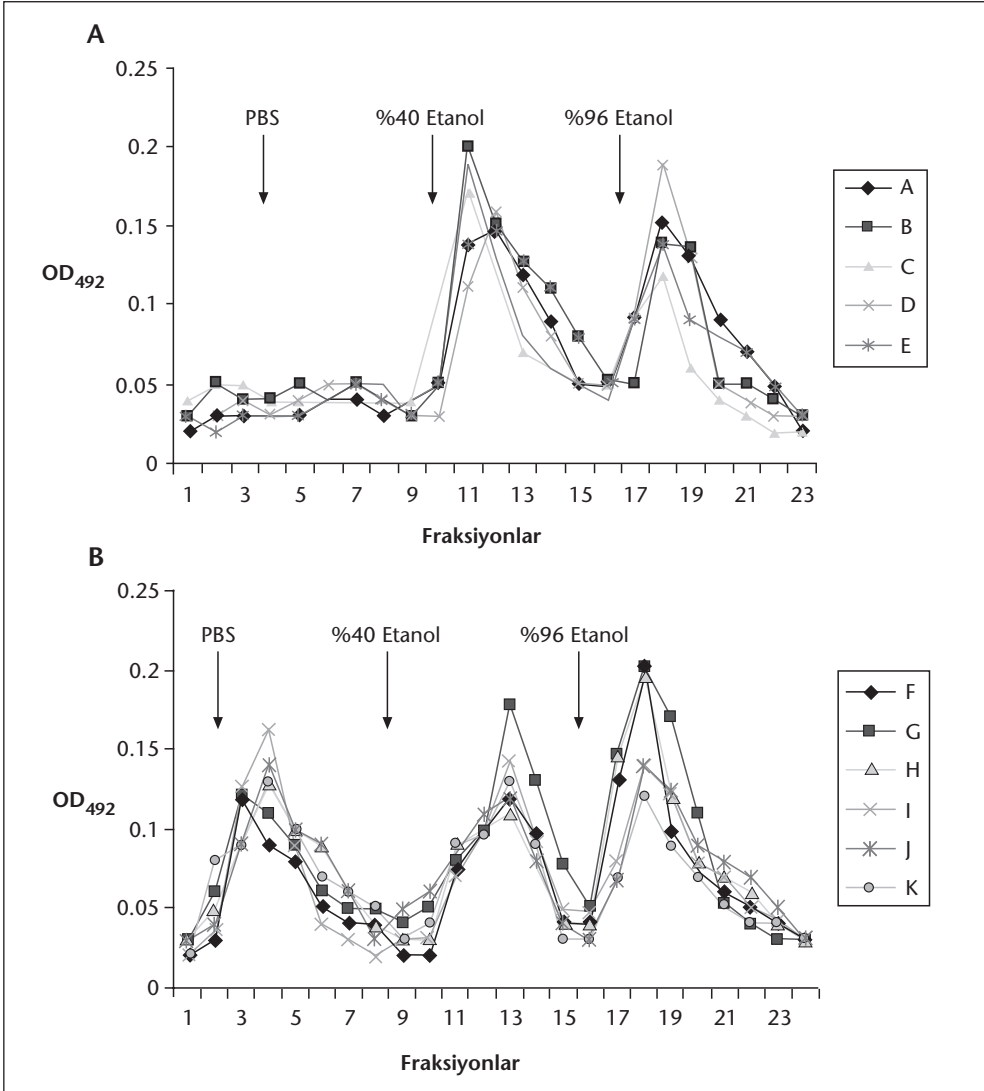
"Slime" pozitif *S.aureus* örneklerinin hem bütil- hem de oktil-sefaroze kromatografisinde PBS ile OD'lerinin değişim göstermediği, ancak kolondan önce %40'lık etanol ve daha sonra da %96'lık etanol geçirildiğinde süzüntünün OD'sinin arttığı saptanmıştır. "Slime" negatif örneklerin bütil- ve oktil-sefaroze ile kromatografisi yapıldığında üç pik oluştuğu saptanmıştır. Birinci pik PBS ile, ikinci ve üçüncü pik ise sırasıyla %40 ve %96'lık etanol ile elde edilmiştir.

Tüm örneklerin fenil-sefaroze ile kromatografisi sonucunda; PBS ile süzüntüye bakteri geçmemiş, bakterileri kolondan süzüntüye geçirmek için önce %40'lık ve daha sonra da %96'lık etanol kullanılması gerekmiştir.

Solüsyonların pH'sı 6, 7, 8 ve 9 olacak şekilde ayarlanarak tüm kromatografi işlemleri bu pH değerlerinde tekrarlandığında sonucun değişmediği saptanmıştır. Ortam ısısının sonuçlar üzerindeki etkisi için de işlemler 4°C'de tekrarlanmış ve yine kromatografik patternlerin değişmediği görülmüştür.

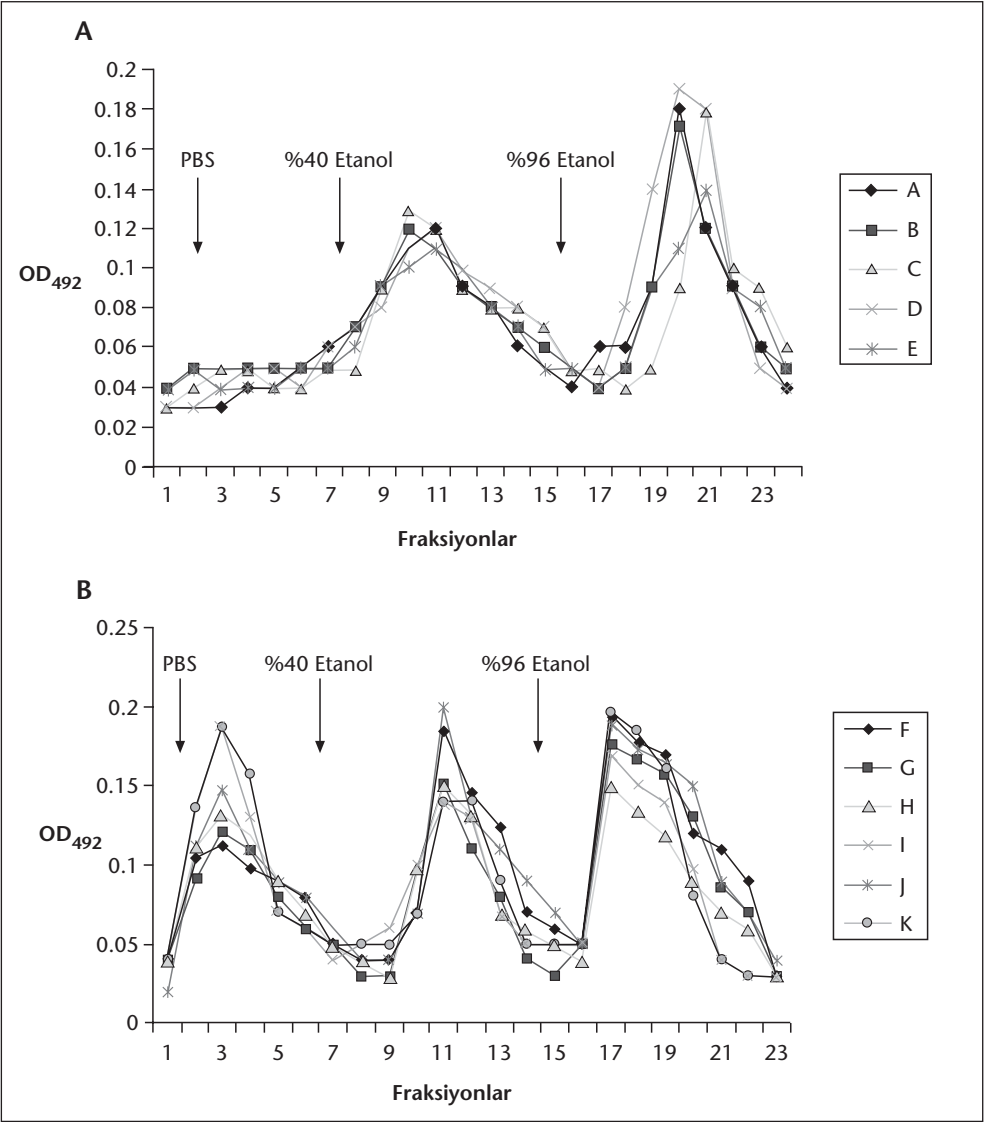
TARTIŞMA

Son yıllarda mikroorganizmaların çeşitli yüzeylere adezyonlarının mekanizması üzerinde çalışmalar yapılmaktadır. Bilindiği gibi epitel hücreleri, fagositik hücreler, dış yüzeyi ve cerrahi implantlar üzerine bakterinin adezyonu, bakterilerin patogeneğinde ilk basamağı oluşturmaktadır. Hücre yüzeyinin elektrik yükü, hidrofobisitesi, hücre dışına salınan polisakkaridler ve bakterinin flajellası bu olayda etkili faktörlerdir^{1,2,9,11,20-24}. "Slime" oluşturan mikroorganizmalar ile kronik enfeksiyonların ilişkili olduğu ve bu mikroorganizmaların ortamdaki temizlenmesinin zor olduğunu gösteren çalışmalar vardır^{3,6,7}.



Şekil 1. *S.aureus* suşlarının bütil-sefaroz ile hidrofobik etkileşim kromatografisi. A: Biyofilm oluşturan suşların elüsyon profili; B: Biyofilm oluşturmeyan suşların elüsyon profili (başlangıç tamponu: 1 mM PBS (pH 7.5); elüsyon tamponu: %40 etanol ve %96 etanol; fraksiyon hacmi: 0.3 ml; akış hızı 1 ml/dakika; absorban 492 nm; K: Biyofilm oluşturmeyan *S.aureus* ATCC 25923).

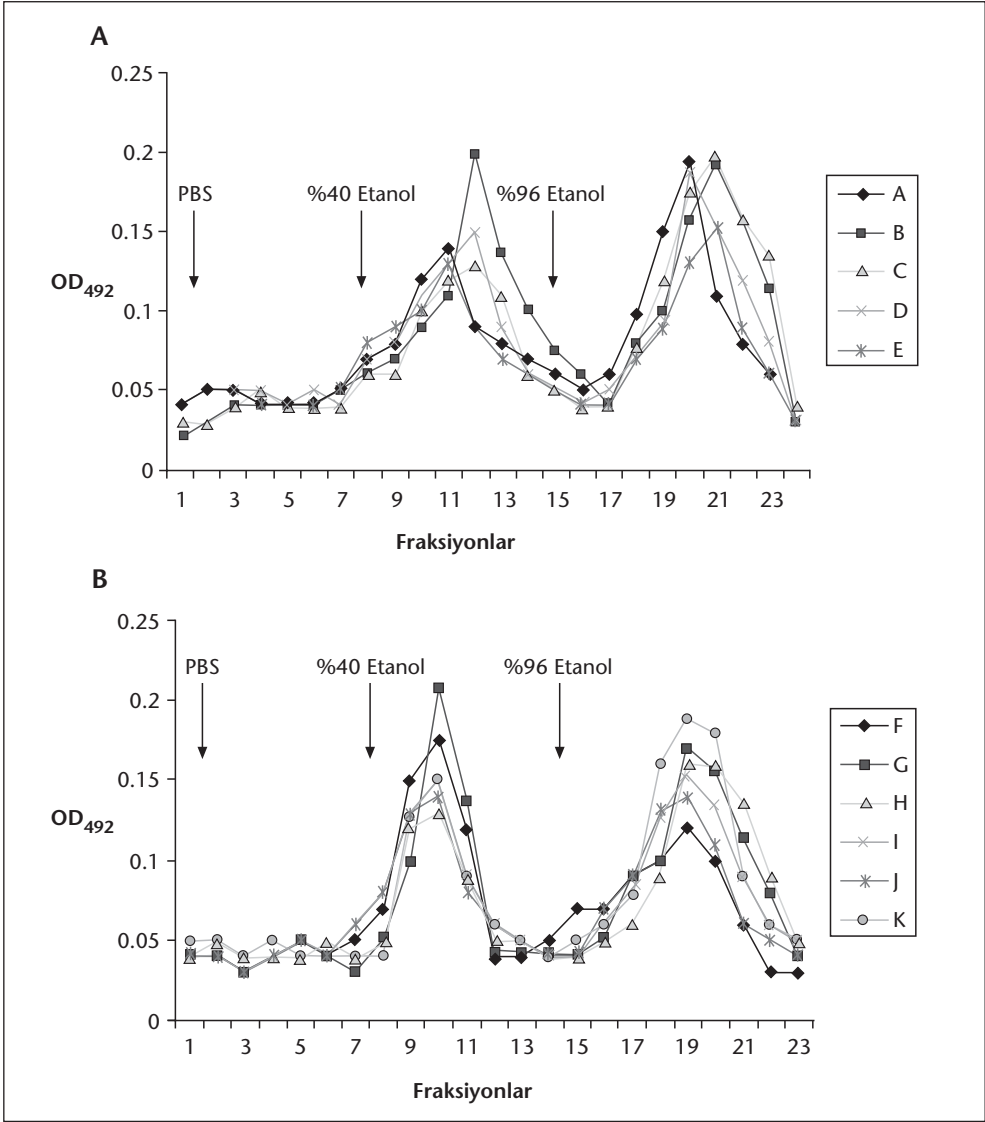
Hücre yüzeyi adezinlerinin salınımı ve "slime" oluşumunun, bakterinin logaritmik üreme döneminde olduğu bilinmektedir. Daha önce yapılan kinetik çalışmalar, stafilkoklarda "slime" oluşumunun inkübasyondan 7-12 saat sonra (logaritmik üreme fazının ortalarına denk gelen süre) başladığını göstermiştir^{2,21}. Hidrofobisite, bakteriyel adezyonda rol oynayan diğer önemli bir faktördür. Mikroorganizmayı oluşturan bazı yapılar, örneğin hücre duvarı, fimbria, bazı lipid bileşikleri, lipoteikoik asit ve dış zarda yer alan fosfo-



Şekil 2. *S.aureus* suşlarının oktil-sefaroze ile hidrofobik etkileşim kromatografisi. A: Biyofilm oluşturan suşların elüsyon profili; B: Biyofilm oluşturmeyen suşların elüsyon profili.

lipidler hidrofobik özelliktedir. Bazı mikroorganizmalarda hidrofobik etki ile enfeksiyon arasındaki ilişki gösterilmiş; bazı *S.aureus* suşlarının da ürettikleri besiyerine hidrofobik özellikte maddeler salgıladığı bildirilmiştir^{2,9}.

Mikroorganizmalarda hücre yüzeyinin hidrofobik özelliklerini araştırmak için çeşitli yöntemler kullanılmıştır. Bunlar arasında; CAM (Contact Angle Measurement), HIC (Hydrophobic Interaction Chromatography), MATH (Microbial Adhesion To Hydrocar-



Şekil 3. *S.aureus* suşlarının fenil-sefaroz ile hidrofobik etkileşim kromatografisi. A: Biyofilm oluşturan suşların elüsyon profili; B: Biyofilm oluşturmeyan suşların elüsyon profili.

bon), SAT (Salt Aggregation Test) ve TPP (Two Phase Partitioning) yöntemleri sayılabilir^{2,4,16,18,20,24}. Bu çalışmada, klinik *S.aureus* suşlarının bütül-, oktil- ve fenil-sefaroza bağlanma açısından bir farklılık gösterip göstermediği HIC yöntemi ile araştırılmış, hidrokarbona bağlanan mikroorganizmaların uzaklaştırılması için sırasıyla PBS, %40'lık etanol ve %96'lık etanol kullanılmıştır. Tüm "slime" pozitif *S.aureus* örnekleri bütül- ve oktil-sefaroz içeren kolonlardan geçirildiğinde, PBS ile hidrokarbondan ayrılmadığı, ancak etanol ile

muamele sonunda iki fraksiyona ayrıldığı gözlenmiştir. Bu fraksiyonlardan birincisi %40'lık etanol ile süzüntüye geçen ve orta derecede bağlanan fraksiyon, ikincisi ise hidrokarbona kuvvetli bağlanan ve ancak %96'lık etanol ile süzüntüye geçen fraksiyon olarak değerlendirilmiştir. Bu bulgular, "slime" pozitif *S.aureus* suşları içinde hidrokarbona bağlanma dereceleri açısından farklılıklar olabileceğini düşündürmektedir. Buna karşın "slime" negatif *S.aureus* suşlarının bütil- ve oktil-sefaroze ile üç farklı fraksiyona ayrıldığı görülmüştür. Bu fraksiyonlardan birincisi; PBS ile süzüntüye geçen ve hidrokarbona bağlanmayan fraksiyon, ikincisi hidrokarbona orta derecede bağlanan ve %40'lık etanol ile süzüntüye geçen fraksiyon ve üçüncüsü hidrokarbona kuvvetli bağlanan ve ancak %96'lık etanol ile süzüntüye geçen fraksiyon olarak değerlendirilmiştir. Buna göre "slime" negatif *S.aureus* suşlarının da farklı derecelerde bağlanma kuvvetine sahip olduğu ve bu nedenle hidrofobik açıdan heterojen olduğu söylenebilir.

Yapılan çalışmalarda, biyofilm oluşturan *S.aureus* suşlarının, oluşturmayan suşlara göre daha hidrofobik olduğu bildirilmektedir²³. Bizim çalışmamızda da, biyofilm oluşturan izolatların daha hidrofobik olduğu, bununla birlikte biyofilm oluşturan suşlar içinde hidrokarbona orta derecede ya da sıkı olarak bağlanan farklı fraksiyonlar bulunduğu saptanmıştır.

Biyofilm oluşturan ve oluşturmayan izolatların fenil-sefaroze ile kromatografisinde orta derecede bağlanan ve kuvvetli bağlanan olmak üzere iki fraksiyon ayrılmıştır. Bu hidrokarbona hem "slime" pozitif hem de "slime" negatif izolatlar aynı şekilde hareket etmiştir. Bu derece yüksek hidrofobisitenin saptanmış olması, *S.aureus* suşları ile fenil ligandları arasındaki π - π etkileşimi ile açıklanabilir^{12,13,18,19}. *S.aureus*'un hidrofobik özelliklerinin araştırıldığı daha önceki çalışmalarda, hidrofobik yüzeylere bağlanma oranları belirlenmiş ve değerler yüzde olarak verilmiştir⁷⁻⁹. Bu çalışmalarda farklı hidrofobik yüzeylere bağlanma açısından, heterojen grupların mevcut olup olmadığı ve HIC paternlerini gösteren bir bulguya rastlanılmadığından, sonuçları karşılaştırma olanağı bulunamamıştır.

Diğer yandan, birçok stafilokok suşunun otoagregasyon özelliği nedeniyle oldukça büyük kümeler oluşturdukları bilinmektedir. Böyle büyük kümeler HIC ortamından geçemediği için yüzey hidrofobik özelliğinin araştırıldığı çalışmalarda doğru ölçüm yapılmasını engelleyebilir²⁵. Çalışmamızda, *S.aureus* örneklerinde PBS ile otoagregasyon görülmediğinden bir sorun teşkil etmemiştir.

Protein HIC'ında pH değişimlerinin önemli etkisi olduğu bilinmektedir^{2,14}. Çalışmamızda farklı pH derecelerinde (pH: 7-9) tekrarlanan testlerde elde edilen sonuçlar arasında bir farklılık olmadığı belirlenmiştir. Ancak pH derecelerinin 7'nin altında ya da 9'un üzerinde olması halinde, mikroorganizmanın yapısının bozulabileceği ve bu nedenle doğru sonuç alınamayacağı düşünüldüğünden daha uç pH dereceleri denenmemiştir. İşlemler 4°C'de tekrarlandığında da sonucun değişmediği saptanmıştır. Ancak çok yüksek ve çok düşük ısılarda farklı sonuçlar elde edilebileceği öngörülebilir.

Sonuç olarak çalışmamızda, biyofilm oluşturan *S.aureus* izolatlarının, oluşturmayan izolatlara göre daha hidrofobik olduğu belirlenmiştir. Ayrıca verilerimiz, saf kültürden hazırlanan *S.aureus* suşlarının içinde farklı hidrofobik bağlanma kuvvetine sahip heterojen

fraksiyonlar bulunabileceğini ve bu heterojen fraksiyonlar arasında hidrofobik yüzey proteinlerinin salgılanma derecelerinin farklı olabileceğini düşündürmektedir. “Slime” pozitif *S.aureus* suşlarının iki, “slime” negatif suşların ise üç fraksiyona ayrıldığı belirlenen çalışmamızda, bu fraksiyonların daha ileri testler yardımı ile karakterize edilmesi ve enfeksiyon oluşturma kapasitelerinin daha ayrıntılı olarak incelenmesine gereksinim olduğu sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Tally FP, Barg NL. Staphylococci: Abscesses and other diseases, pp: 135-42. In: Schaechter M, Engleberg NC, Eisenstein BI, Medoff G (eds), Mechanisms of Microbial Disease. 1999, 3th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore.
2. Harris LG, Foster SJ, Richards RG. An introduction to *Staphylococcus aureus* and techniques for identifying and quantifying *S.aureus* adhesins in relation to adhesion to biomaterials: review. Eur Cell Mater 2002; 4: 39-60.
3. Bannerman TL. Staphylococcus, Micrococcus, and other catalase-positive cocci that grow aerobically, pp: 384-404. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC (eds), Manual of Clinical Microbiology. 2003, 8th ed. ASM, Washington DC.
4. Rosenberg M, Gutnick D, Rosenberg E. Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. Fems Microbiol Lett 1980; 9: 29-33.
5. Akiyama H, Yamasaki O, Kanzaki H, Tada J, Arata J. Adherence characteristics of *Staphylococcus aureus* and coagulase negative staphylococci isolated from various skin lesions. J Dermatol 1998; 18: 132-6.
6. Arciola CR, Campoccia D, Montanaro L. Detection of biofilm-forming strains of *Staphylococcus epidermidis* and *S.aureus*. Expert Rev Mol Diagn 2002; 2: 478-84.
7. Litzler PY, Benard L, Barbier-Freboung N, et al. Biofilm formation on pyrolytic carbon heart valves: influence of surface free energy, roughness, and bacterial species. J Thorac Cardiovasc Surg 2007; 134: 1025-32.
8. Das DC, Kapoor KN, Mukhopadhyay M. Comparative evaluation of hydrophobicity measures for virulence determination of *Staphylococcus epidermidis* from hospitalized patients and healthy individuals. Indian J Med Res 2001; 114: 160-3.
9. Hall-Stoodley L, Stoodley P. Biofilm formation and dispersal and the transmission of human pathogens. Trends Microbiol 2005; 13: 7-10.
10. Sudagidan M, Erdem I, Cavusoglu C, Ciftcioglu M. Investigation of the surface properties of *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from biomaterials. Mikrobiyol Bul 2010; 44: 93-103.
11. Rosenberg M. Microbial adhesion to hydrocarbons: twenty-five years of doing MATH. Fems Microbiol Lett 2006; 262: 129-34.
12. Phalman S. Adsorption of proteins at high salt concentrations on hydrophobically interacting matrices, pp: 161-71. In: Ostenhof OH, Breitenbach M, Coller F, Kraft D, Schenier O (eds), Affinity Chromatography. 1978, Pergamon, UK.
13. Porath J. Salt promoted adsorption: recent developments. J Chromatogr 1986; 376: 331-41.
14. Scouten WH (ed). Hydrophobic chromatography, pp: 241-8. In: Affinity Chromatography: Bioselective Adsorption on Inert Matrices. 1981. Wiley-Interscience, New York.
15. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 8th Informational Supplement. Document M100-S18, 2008. CLSI, Wayne, PA.
16. Christensen GD, Simpson WA, Bisno AL, Beachey EH. Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. Infect Immun 1982; 37: 318-26.
17. Chapin KC, Lauderdale TL. Reagents, stains, and media: Bacteriology, pp: 354-83. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC (eds), Manual of Clinical Microbiology. 2003, 8th ed. ASM Press, Washington, DC.

18. Pembrey RS, Marshall KC, Schneider RP. Cell surface analysis techniques: What do cell preparation protocols do to cell surface properties? *Appl Environ Microb* 1999; 65: 2877-94.
19. Hydrophobic Interaction Chromatography. Principles and methods. 2000, Amersham Pharmacia Biotech AB. Catalog no:18-1020-90, ISBN 91-970490-4-2, Sweden.
20. Galliani S, Viot M, Crémieux A, van der Auwera P. Early adhesion of bacteremic strains of *Staphylococcus epidermidis* to polystyrene: influence of hydrophobicity slime production, plasma, albumin, fibrinogen and fibronectin. *J Lab Clin Med* 1994; 123: 685-92.
21. Doyle RJ. Contribution of the hydrophobic effect to microbial infection. *Microbes Infect* 2000; 2: 391-400.
22. Krepsky N, Rocha Ferreira RB, Ferreira Nunes AP, et al. Cell surface hydrophobicity and slime production of *Staphylococcus epidermidis* Brazilian isolates. *Curr Microbiol* 2003; 46: 280-6.
23. 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: 345-54.
24. Malm A, Blernasluk A, Los R, et al. Slime production and cell surface hydrophobicity of nasopharyngeal and skin staphylococci isolated from healthy people. *Pol J Microbiol* 2005; 54: 117-21.
25. Ljungh A, Hjerten S, Wadström T. High surface hydrophobicity of autoaggregating *Staphylococcus aureus* strains isolated from human infections studied with the salt aggregation test. *Infect Immun* 1985; 47: 522-6.