

T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
MİKROBİYOLOJİ ABD

STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS
SUŞLARININ SLAYM OLUŞTURMASINDA
Mg, Ca, EDTA VE pH' NİN ETKİLERİ

(DOKTORA TEZİ)

111761

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM BAKANLIĞI
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

TEZ YÖNETİCİSİ
PROF.DR. KADRI GÜL

ARŞ.GÖR. NEZAHAT ÖZERDEM AKPOLAT

111761

DİYARBAKIR 2000

İÇİNDEKİLER

Giriş	1
Genel Bilgiler	3
Materyal ve Metod	9
Bulgular	15
Tartışma	31
Özet	37
Summary	38
Literatürler	39

GİRİŞ

Koagülaz negatif stafilokoklar (KONS) önceleri kültür kontaminantları olarak düşünölmüş ve fazla önemsenmemiş iken hastahane kökenli fırsatçı patojen bakteriler arasındaki önemleri giderek artmıştır (18,28,34,40,57,59,60). Günümüzde KONS'lar özellikle *Staphylococcus epidermidis*, katater başta olmak üzere aletli girişim yapılmış hastalarda önemli bir nazokomial patojen olarak kabul edilmektedir (6,12,15,46).

Bayston ve Penny'nin (7) *S.epidermidis* suşlarının slaym adı verilen mukoid ekstrasellöler bir madde oluşturduklarını ileri sürmeleri ile birlikte birçok araştırmacı in vivo ve in vitro çalışmalarda bu mikroorganizmaların bir kısmının slaym oluşturduklarını gözlemişlerdir (8,34,38). Slaym oluşturan bakterilerin bu madde içine gömüldükleri ve birbirleri ile kümeleşmeler oluşturdukları elektron mikroskobu ile de ortaya konulmuştur (11,33,63).

S.epidermidis'e bağılı infeksiyonlarda slaym maddesinin bir virulans faktörü olarak değerlendirilebileceğı birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir (16,18,40,46,52). Slaym üretebilen *S.epidermidis* suşlarının fagositoza ve kemotaksis'e direnç özelliğı gösterdikleri, bakteriyi vücudun doğal savunma mekanizmalarına karşı koruyarak, hücresele ve humoral immun cevabı olumsuz yönde etkilediğı gösterilmiştir. Ayrıca slaym oluşturan stafilokokların birçok antibiyotiğıe karşı daha dirençli oldukları da belirtilmiştir (2,3,16,23,30,37,38).

Slaym oluşturan *S.epidermidis* suşlarının Spitz Holter şantından izole edilmesinden bu yana slaym ile ilgili pek çok çalışma yapılmış ve bu çalışmaların önemli bir kısmında *S.epidermidis* suşlarının çeşitli yüzeylere adezyonunu ve slaym oluşumunu etkileyen birçok faktör bulunduğu belirtilmiştir. Örneğın; implante edilen aletin kimyasal yapısı, hidrofob özellikteki yüzeyi, ortamın pH'sı, ortamdaki magnezyum, kalsiyum gibi

iki değerlikli katyonların ve diğer eser elementlerin konsantrasyonu ve EDTA gibi bu konsantrasyonu etkileyen maddelerin bakterilerin yüzeye adezyonunu dolayısıyla kolonizasyonunu ve slaym maddesinin oluşumunu etkilediğini bildiren çalışmalar bulunmaktadır (4, 24, 61, 64).

Özellikle metabolik bozukluğu olan ve maligniteli hastalarda *S.epidermidis* gibi fırsatçı patojen infeksiyonlarının yüksek olması; bu tip hastalarda immunosupressif ilaç kullanımı, hiperkalseminin yüksek oranda görülmesi, yüksek konsantrasyonlarda katyon içeren intravenöz solüsyonların kullanımı ve lokal enflamasyon gibi sebeplerin bakteriyel adezyon artışına neden olabileceğini düşündürmektedir. Çalışmamız bu tip hastalarda slaym üreten bakteriyel infeksiyonların önemini belirleyecek çalışmalar için bir ön araştırma olarak değerlendirilebilir. Bu nedenle, çeşitli hastalık materyallerinden izole edilen *S.epidermidis* suşlarının slaym oluşturma özellikleri Christensen ve Kongo Kırmızılı agar yöntemleriyle saptanmış ve kantitatif mikro yöntem kullanılarak Ca^{+2} , Mg^{+2} , EDTA ve pH'nın slaym oluşumuna etkisi araştırılmıştır.

GENEL BİLGİLER

Micrococcaceae familyası içinde yer alan stafilokok cinsi bakteriler oldukça eski zamanlardan beri bilinen Gram pozitif, hareketsiz, genellikle katalaz olumlu koklardır. Fakültatif anaerop olup daha çok aerop üremeyi yeğ tutarlar. DNA/DNA ilişkileri ve fenotipik özelliklerine göre stafilokok cinsinde bu güne kadar 20 civarında tür saptanmış olup, bazı kökenler hala inceleme aşamasındadır. Stafilokokların çoğu sıcak kanlı hayvanların derisinde, deri ile ilişkili bezlerin kanallarında ve mukozalarında doğal olarak barınırlar. Bir kısmı da insan ve hayvanlar için patojen ve çoğu fırsatçı patojenlerdir. İnsan ve hayvanlarda çeşitli hastalıklara yol açabilen stafilokoklar koagülaz oluşturup oluşturmamalarına göre iki temel gruba ayrılırlar. Koagülaz olumlu stafilokoklar büyük çoğunlukla *S.aureus* iken, KONS grubunda ise *S.epidermidis*, *S.capitis*, *S.hominis*, *S.saprophyticus* gibi türler bulunmaktadır. KONS' lar insanda yerleşim bakımından yaygın bir özellik gösterir. Burun deliği mukozası, aksiller, inguinal, peritoneal bölgeler, ayak parmakları ve derinin diğer kısımlarında doğal olarak kolonize olurlar. Önceleri KONS' ların vücut florasında kommensal ve zararsız yaşadıkları bilinirdi. Ancak hematolojik ve diğer maligniteli immun yetmezliği olan hastalarda septiseminin ana etkeni olarak saptanması, intravasküler katater, santral sinir sistemi şantı, ortopedik protez ve periton diyaliz infeksiyonlarında ve endokardit vakalarında sıklıkla izole edilmiş olmaları önemlerini artırmıştır (7, 9, 11, 12, 16, 31, 36, 43, 50, 52).

Amerika'da intravasküler kataterle ilişkili yıllık yaklaşık 50000 septisemi vakası bildirilmiş ve son yıllarda KONS' ların neden olduğu bakteriyemilerin 3-4 kat arttığı, bu artışın intravasküler aygıt kullanımı ile paralellik gösterdiği saptanmıştır (12, 16, 26, 36, 60). Yapılan çalışmalarda, KONS' ların neden olduğu infeksiyonlarda en sık izole edilen etkenin *S.epidermidis* olduğu gösterilmiştir. Bir tiplendirme çalışmasında 400 klinik izolatin %75.5' ni

S.epidermidis'in oluşturduğu bildirilmiştir (47). Kloos ve Jangerson (39) da biyokimyasal olarak identifiye edilen bütün KONS' ların %70' inin *S.epidermidis* olduğunu bulmuşlardır.

Özellikle yabancı madde ilişkili infeksiyonlarda bu bakterilerin mukoid yapıda slaym adı verilen bir madde oluşturdukları saptanmıştır (1, 5, 20, 36, 48, 55). Callaghan ve arkadaşları (10), Spitz Holter kapağına *S.epidermidis*'in kolonize olduğunu göstermişlerdir. Daha sonra Bayston ve Penny (7) Spitz Holter kapakları üzerinde *S.epidermidis* suşları tarafından salgılanmış mukoid bir maddenin olduğunu tespit etmiş ve bu maddenin şant infeksiyonlarının patogeneğinde önemli olduğunu ileri sürmüşlerdir. Elektron mikroskobu ile yapılan araştırmalarda da mikroorganizmaların bu ekstrasellüler madde içerisinde buldukları gösterilmiştir (36, 63). Christensen ve arkadaşları (11), intravasküler kataterle ilişkili bir sepsis salgınında etkenin *S.epidermidis* olduğunu saptamışlar ve izole edilen suşların %63' ünün intravasküler katater yüzeylerinde ve kültür tüplerinin duvarlarında slaym tabakası oluşturduklarını gözlemişlerdir. KONS' ların slaym oluşturma özellikleri üzerine şu anki ilgi Christensen ve arkadaşlarının slaym oluşumunu ortaya koyabilecek bir metod bulmalarıyla başlamış, daha sonraları yapılan çalışmalarla slaym ile ilgili birçok yeni yöntem geliştirilmiştir (27, 51, 58).

Slaym maddesi birçok bakteri türünde bulunan kapsüle kimyasal yapı ve fiziksel yerleşimi açısından benzemektedir. Ancak, gerçek bir bakteri kapsülünden bazı farklılıklar gösterir, hücre yüzeyine daha gevşek olarak tutunmuştur ve tek bir bakteri yanında aynı anda birden fazla bakteriyi' de sarabilir. Slaym maddesi suda çözülebilir özellik gösterir ve yıkama işlemi ile bakteriden uzaklaştırılabilir. Katı ortamda yapışkan bir kıvam oluşturmakta, sıvı ortamın yoğunluğunu artırmaktadır (36, 41, 54).

Bakteri hücre duvarının dışında bulunan ekzopolimerler slaym veya kapsül olarak adlandırılabilir. Eğer bir ekzopolimer bakteri duvarına bir şekilde bağlı kalırsa kapsül olarak

tanımlanır. Bu ekzopolimerler, bakteri hücresi dışına salgılanmış ve kültür filtratlarında birikmişse slaym olarak adlandırılır. Glikokaliks terimi hem kapsül hem de slaymı içererek kullanılır. Glikokaliks, Gram pozitif bir organizmanın peptidoglikanında veya Gram negatif hücrenin dış membranının üzerinde bulunan bakteri orijinli, polisakkarit içeren bir materyal olarak tanımlanmıştır (14, 36, 55, 56). Uzun süre bu terimlerin kullanılmasında bir anlam kargaşası yaşanmıştır.

Bu arada slaym ile ilgili yapılan çalışmalarda sık kullanılan bazı terimlerin tanımlarını belirtmek yararlı olacaktır.

- Katı bir ortam üzerinde bakterilerin ve ekstrasellüler materyallerin birikimi biofilm olarak adlandırılır.
- İster slaym negatif, ister slaym pozitif olsun, bir bakterinin direkt olarak bir yüzeye yapışması aderans olarak tanımlanmaktadır.
- Biofilm oluşturan ekstrasellüler biopolimer birikimleri slaym olarak adlandırılır. Slaym oluşumu için tek bir biopolimer olması gerekmez. Ayrıca büyük miktarlarda bulunan slaym, organizmanın yüzeye yapışmasında primer ajan olarak gerekli değildir.

Kimyasal yapısı tam olarak ortaya konulmamış olmasına rağmen, genelde *S.epidermidis* kaynaklı slaym maddesinin proteinler, heksosaminler, nötral şekerler (glukoz, fruktoz, ksiloz gibi), fosfatlı bileşikler, üronik asitler ve az miktarda fosfatlı yapılar içeren kompleks bir glikokonjugat olduğu ve prostetik aygıtlar üzerinde kolonizasyonu artırdığı bildirilmiştir (1, 30, 41, 44, 54).

Bilindiği gibi mononükleer hücrelerden özellikle makrofajlar mikroorganizmalara karşı savunma sisteminin ön çizgisinde yer alan hücrelerdir. Fagositoz sonrası salgıladıkları reaktif oksijen radikalleri, nitrojen radikalleri ve lizozomal enzimler aracılığı ile etken ajanı

öldürürler. Slaym maddesinin ise KONS' ları fagositozdan koruyarak önemli bir virulans faktörü olduğu gösterilmiştir (1, 3, 6, 31).

Slaym maddesinin, bakteriyi vücudun savunma mekanizmalarına karşı koruyarak immun sistem üzerine etkili olduğunu bildiren çeşitli araştırmalar vardır. Johnson ve arkadaşları (37) slaym' ın insan nötrofil fonksiyonlarını etkilediğini, Noble ve arkadaşları (49) nötrofillerin bakterisidal etkinliğini inhibe ettiğini, Gray ve arkadaşları (30) da mononükleer hücrelerin poliklonal uyarıcılara karşı lenfoproliferatif yanıtı baskıladığını bildirmişlerdir. Bir başka çalışmada da *S.epidermidis* kaynaklı slaym maddesinin mononükleer hücrelerden gamma interferon (IFN-8) ve tümör nekroz faktörü (TNF) salgılanmasına neden olduğu belirtilmiştir (2).

Slaym pozitif KONS' ların oluşturduğu enfeksiyonların klinik tablosu ve tedavisi ile ilgili çalışmalarda slaym oluşumu ile antibiyotik direnci arasında da bir ilişki bulunmuştur. Slaym maddesinin mikroorganizmaları çevreleyen bir bariyer oluşturarak, antibiyotik direncine neden olabileceği belirtilmiştir. Özellikle prostetik aygıt enfeksiyonlarında tedavinin daha güç olduğu ve bu nedenle cerrahi girişime gereksinim olabileceği gösterilmiştir (8, 25, 44, 48.).

Virulans faktörlerinden biri olarak kabul edilen slaym oluşumunun, enfeksiyonlardaki rolünü tam olarak ortaya koyabilmek için yapılan çalışmaların çoğunda implant'a bağlı enfeksiyonlardan izole edilen organizmaların deri ve çevresel kaynaklı olanlardan daha fazla slaym oluşturduğu bildirilmiştir (6, 16, 56, 57).

Bakterilerin yüzeylere adezyonu için önce ekstrasellüler slaym maddesinin oluşturulduğu ve bu sayede yüzeye tutunabildiği rapor edilmiş ve bütün slaym pozitif bakterilerin aderan oldukları savunulmuştur. Bu nedenle de slaym oluşumu ve aderan terimleri birbirlerinin yerine kullanılmıştır. Fakat Younger ve arkadaşları (65) bazı aderan organizmaların slaym oluşturmadıklarını tespit etmiştir. Buna benzer başka çalışmalarda da

hem slaym pozitif hem de slaym negatif *S.epidermidis* suşlarının plastik yüzeylere adere olabildikleri gözlenmiştir (13, 21, 22).

Daha sonraları yapılan çalışmalarda (13, 21, 33); organizmaların implante edilen yüzeylere kolonizasyonunun iki aşamada gerçekleştiği; birinci aşamada organizmaların implanta adere olduğu, ikinci aşamada ise adezyondan kısa bir süre sonra organizmaların çoğalarak mikrokoloniler ve bu arada bazı suşların ekstrasellüler slaym maddesini meydana getirdiği gösterilmiştir. Bu aşamada oluşan slaym maddesinin mikroorganizmayı konağın savunma mekanizmalarından koruduğu için kolonizasyonu artırdığı, aynı zamanda antimikrobiyal ilaçlara karşı direnci sağladığı belirtilmiştir. Bu nedenle de implanta bağlı infeksiyonları elimine etmek veya azaltmak için organizmaların kolonizasyonunu önlemede birinci aşamanın hedeflenmesi gerektiği bildirilmiştir.

Yapılan çalışmalar *S.epidermidis* suşlarının hem primer adezyonunu hem de slaym oluşumunu etkileyen çeşitli faktörlerin bulunduğunu göstermiştir (64). Bakteriler hücre yüzeylerinde bulunan hidrofob özellikteki proteinleri ile adere olurlar. Bu proteinlerin harab olması bağlanmalarını önler. Ayrıca implante edilen aletin kimyasal yapısının da (kısmen de olsa) bağlantının gerçekleşmesinde rol oynadığı bildirilmiştir (29). İn vivo ortamlarda bulunan plasma fibrinojen ve fibrinektin'in adezyonu etkilediğine dair elde edilen sonuçlar ise tartışmalıdır (36). Buna karşın hem in vivo hemde in vitro koşullarda sınırlı miktardaki demirin slaym oluşumunu artırdığı gösterilmiştir (17, 24).

S.epidermidis suşlarının kolonize olmalarını etkileyebileceği düşünülen diğer faktörler ise ortamda bulunan Ca^{+2} ve Mg^{+2} gibi iki değerlikli katyonlardır. Özellikle kalsiyum ve magnezyum'un hem organizmaların çeşitli yüzeylere hem de birbirlerine yapışarak kolonize olmalarında rol oynayabileceği belirtilmiştir (22). Ortamın oksidoredüksiyon potansiyelinin de slaym oluşumunda etkili olabileceği ve oksijensiz ortamlarda slaym üretim kapasitelerinin

azaldığı bildirilmiştir (17, 53). Ayrıca ortamın pH' ısı, ortamda bulunan eser elementler, mikroorganizmaların üretildiği ortamlardaki besleyici maddelerin yapısı ve miktarı gibi pek çok özellik slaym oluşumunu etkileyen çevresel etmenler arasında ele alınmaktadır (17, 21, 22).



MATERYAL VE METOD

SUŞLAR

Çalışmada *S.epidermidis* izolatları kullanıldı. Bu mikroorganizmalar çeşitli kliniklerden gönderilen kan, idrar, kateter, toraks seti, kelebek seti gibi materyallerden izole edildi. *S.epidermidis* suşlarının koloni morfolojileri, mikroskopik görünümleri, katalaz ve koagülaz reaksiyonları değerlendirildi. Aynı zamanda izole edilen mikroorganizmaların tür tayinleri Sceptor (API, Lot Ch-B 1000601304 Becton Dickinson Europe, Cedex, France) sistem kullanılarak yapıldı.

KATALAZ TESTİ

Stafilokokları streptokoklardan ayırt etmek için yapılır. Katalaz enzimi yapan stafilokoklar hidrojen peroksiti su ve oksijene ayrıştırır. Bu nedenle bu enzim hidrojen peroksit ile araştırılır. Bunun için “ Lam deneyi ” kullanıldı.

İçerisinde kan bulunmayan bir besiyerinde üretilmiş bakteri kolonilerinden öze ile alınıp bir lamın üzerine konur. Üzerine bir, iki damla H_2O_2 damlatılıp, karıştırılır. Katalaz olumlu olan stafilokoklar gaz kabarcıkları oluştururlar. Streptokoklar ise katalaz negatiftirler.

KOAGÜLAZ TESTİ

Koagülaz negatif ve koagülaz pozitif stafilokokların birbirinden ayırt edilmesinde en çok önem taşıyan deneydir. Stafilokok koloni görüntüsü veren ve Gram boyasında olumlu olduğu saptanan tüm koklar için yapılmalıdır. Pigment, hemoliz, mannitole etki gibi deneylerin hiçbirisi özellikle *S. aureus*'un ayırımında bu kadar değerli değildir. Koagülaz deneyi lamda ve tüpde yapılabilir. Bunun için “ Lam deneyi ” kullanıldı. Lam deneyi yapmak için insan plazması 1/5 oranında serum fizyolojik ile sulandırılır. Temiz bir

lam üzerine sulandırılmış plazmadan bir damla damlatılır. Stafilocok kolonisinden öze ile alınarak plazma içinde homojen süspansiyon oluşturulur. 5 - 10 sn' de pıhtılardan ibaret kümelerin oluşması olumlu, kümeleşmelerin gözlenmediği homojen karışımlar olumsuz sayılır. Çalışmada koagülaz negatif olduğu saptanan suşlar kullanıldı.

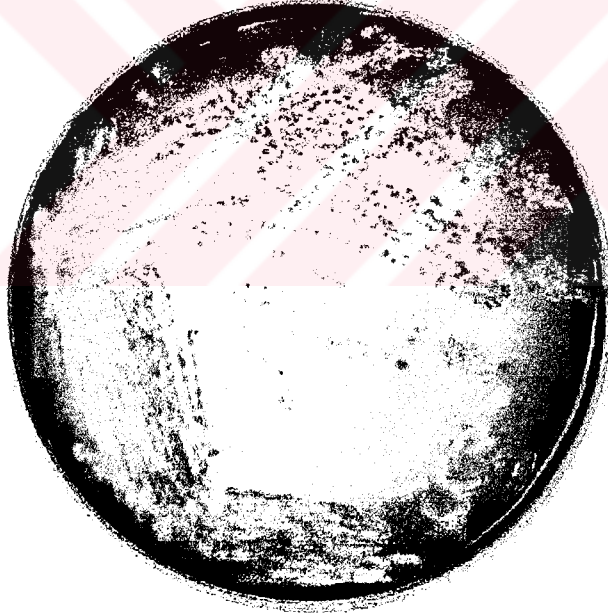
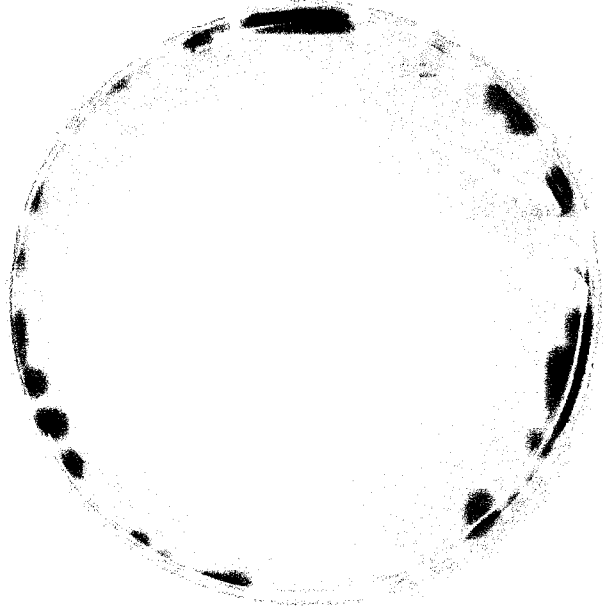
Bu şekilde soyutlanmış *S.epidermidis* izolatlarının slaym oluşturma özellikleri; Kongo Kırmızılı agar yöntemi ve Christensen metodu kullanılarak araştırıldı.

KONGO KIRMIZILI AGAR YÖNTEMİ

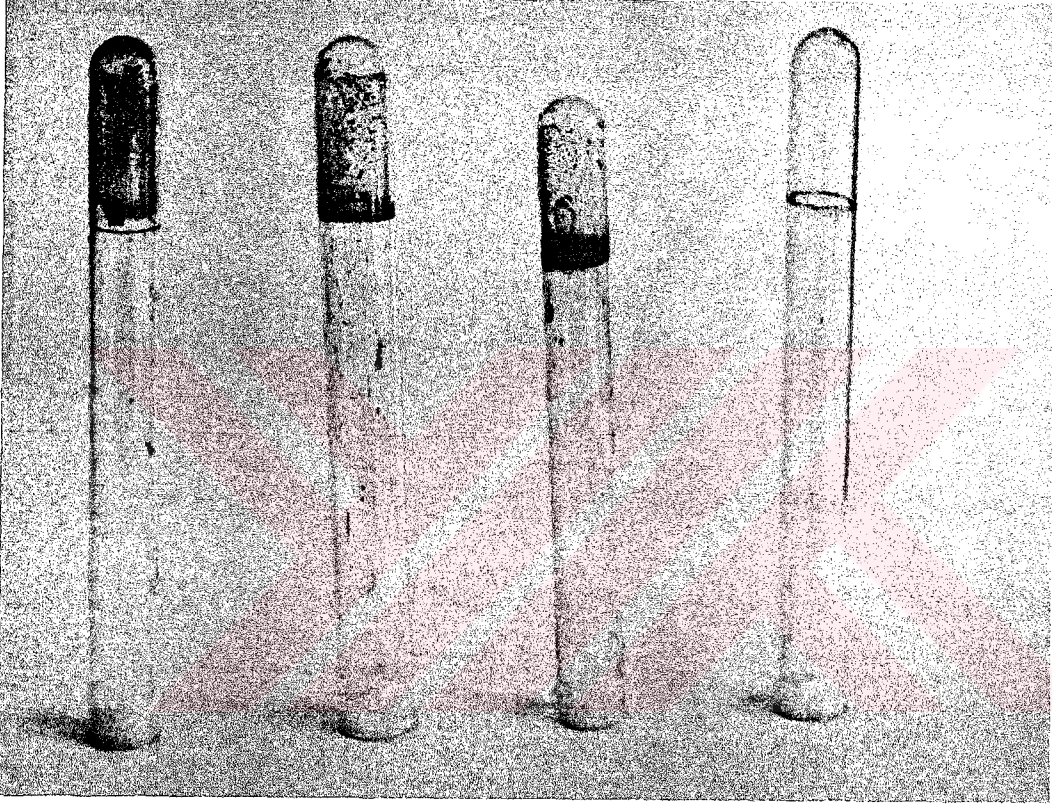
Freeman ve arkadaşlarının (27) tanımladıkları gibi; Litrede 10g agar, 50g süzkroz, 37g Brain Hearth Infusion Broth (oxoid) ve 0.8g Kongo Kırmızısı (oxoid) içeren besiyerlerine yapılan ekimler 37°C' de 24 saat inkübe edildi. Siyah koloni oluşturan izolatlar slaym pozitif, kırmızı pembe koloni oluşturanlar ise slaym negatif olarak değerlendirildi (Şekil 1).

CHRISTENSEN METODU

Metod, Christensen ve arkadaşlarının tanımlamasına göre uygulandı (11). Daha önce kanlı agara pasajları yapılan izolatların taze kültürleri hazırlandıktan sonra 5 ml. Tryptic soy broth (TSB, oxoid) içeren tüplere Mc Farland 1×10^5 CFU/ml. bulanıklığında ekimleri yapıldı. Tüpler 37°C' de 48 saat inkübe edildikten sonra içerikleri yavaşça boşaltıldı. Tüplere %1' lik safranin (sigma) solüsyonu eklendi. Tüpler oda ısısında 30 dakika bekletilip içerikler boşaltıldı ve iki kez fosfat tamponu (pH 7.2) ile yıkandı. Tüpler ters çevrilerek kuruması için beklendi. Slaym oluşumu tüplerin duvarında boyalı film tabaka oluşumuna bakılarak değerlendirildi. Hava – sıvı bileşim yerinde görülen boya tutulumu değerlendirilmeye alınmadı. (Şekil 2).



Şekil 1 : Kongo Kırmızılı agar besiyerinde slaym pozitif (altta) ve slaym negatif (üstte) koloni görüntüsü.



Şekil 2. Slaym pozitif (sağda) test tüplerinde slaym oluşumu ve slaym negatif (solda) test tüpü

Çalışmada hem Christensen hem de Kongo Kırmızılı agar metoduyla slaym oluşturduğu saptanan 15 *S.epidermidis* suşu ile 13 slaym negatif suş kullanıldı. Pfaller ve arkadaşlarının (58) tanımladıkları kantitatif mikro yöntem kullanılarak, bu suşların slaym oluşturma kapasiteleri üzerine kalsiyum (Ca^{+2}), magnezyum (Mg^{+2}), pH ve EDTA'nın (etilen diamin tetra asetik) etkileri araştırıldı.

KANTİTATİF MİKRO YÖNTEM

S.epidermidis suşlarının mikropleytlerde slaym oluşturma özellikleri Pfaller ve arkadaşlarının (58) tarif ettikleri şekilde yapıldı. Bu yöntemde 96 kuyucuklu, steril, düz tabanlı polyestern mikropleytler kullanıldı. Test edilecek bütün mikroorganizmaların 24 saatlik taze kültürlerinden 1×10^5 CFU/ml yoğunlukta süspansiyonları hazırlandı. Kuyucuklara bu süspansiyonların her birinden 0,2 ml konuldu ve pleytler $37^{\circ}C$ ' de 48 saat aerop koşullarda inkübe edildi. Daha sonra kuyucukların içeriği dikkatlice boşaltılarak iki kez fosfat tamponu (pH 7.2) ile yıkandı ve %1' lik safranin ile boyandı. Boyanın uzaklaştırılması için tekrar yıkandı, kurumaya bırakıldı. Kuyucuklar mikro ELISA okuyucusu ile 490 nm dalga boyunda okundu. Kontrol amacıyla çalışma yapılan her mikropleytte steril TSB ve F 544 slaym negatif ile F 162 slaym pozitif *S.epidermidis* (Dr. R. Bayston, Nottingham City Hospital) kontrol suşları da kullanıldı.

KALSİYUM

Ca^{+2} 'nin slaym oluşumu üzerine etkisini araştırmak için $CaCl_2$ kullanıldı. Litrede sırasıyla 8 μM , 16 μM , 32 μM , 64 μM , 128 μM ve 256 μM kalsiyum içeren TSB'ler hazırlandı ve kantitatif mikro yöntem ile incelendi.

MAGNEZYUM

Magnezyum' un ($MgSO_4$ olarak kullanıldı), slaym pozitif ve slaym negatif *S.epidermidis* suşlarının slaym oluşturma kapasiteleri üzerine etkisi, yine altı farklı konsantrasyonda (8 μM , 16 μM , 32 μM , 64 μM , 128 μM , 256 μM) Mg^{+2} içeren TSB'ler hazırlanarak araştırıldı.

EDTA

EDTA' nın etkisini inceleyebilmek için 1 mM, 2 mM, 4 mM, 8 mM, 16 mM, 32 mM konsantrasyonlarında EDTA içeren TSB'ler hazırlandı ve yine kantitatif mikro yöntemle gözlemlendi.

pH

pH' nın etkisini çalışmak için 0,1 N'lik HCL ve 0,1 N'lik NaOH solüsyonları hazırlandı. Bu solüsyonlar kullanılarak pH' ları 5,6,7,8 ve 9 olan besiyerleri hazırlandı. Aynı şekilde bütün bakteriler bütün pH'larda mikro yöntemle çalışıldı ve pH 7 baz alınarak pH'nın slaym oluşumu üzerine olan etkisi incelendi.

İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Araştırmamızda kantitatif mikro yöntem ile yapılan testler üç kez tekrar edildi ve elde edilen sonuçların ortalamaları kutu grafikleri ile gösterildi (Şekil 3,4,5,6)

Çalışmanın istatistiksel analizleri bağımsız ve eşleştirilmiş t testleri kullanılarak yapıldı.

BULGULAR

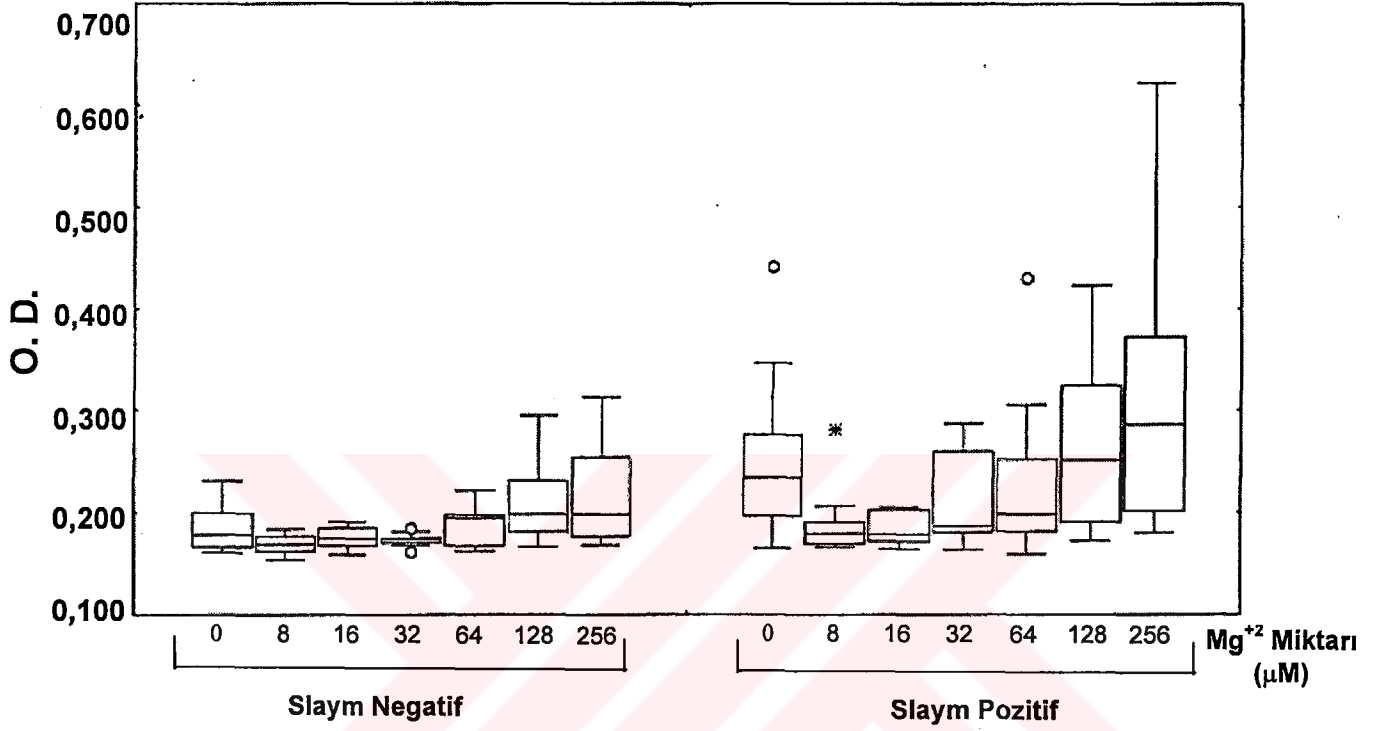
Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *S.epidermidis* suşlarının slaym oluşumu Kongo Kırmızılı agar ve Christensen tüp yöntemi ile gözlemlendi. Her iki yöntem ile slaym oluşumu incelenen ve slaym pozitif olduğu saptanan *S.epidermidis* suşu ve 13 slaym negatif *S.epidermidis* suşu kullanıldı.

MAGNEZYUM

Mg^{+2} , un slaym oluşumuna etkisi TSB' de gittikçe artan konsantrasyonlarda Mg^{+2} ilave edilerek incelendi. Şekil 3' de de görüldüğü gibi düşük konsantrasyonlardaki (özellikle $8\mu M$ ve $16\mu M$) Mg^{+2} , un slaym oluşumunu artırmayıp aksine azaltıcı etki gösterdiği saptandı. $128\mu M$ ve $256\mu M$ Mg^{+2} içeren TSB' de slaym oluşumunun arttığı gözlemlendi. Ancak istatistiksel açıdan bu farklılık normal TSB ile kıyaslandığında anlamlı bulunmadı (Tablo 1).

Farklı oranlarda Mg^{+2} içeren besiyerleri konsantrasyonlarına bağlı olarak karşılaştırıldığında, artan Mg^{+2} konsantrasyonunun slaym oluşumunu artırdığı gözlemlendi

Farklı konsantrasyonlardaki Mg^{+2} , un slaym pozitif grupta slaym oluşumuna etkisi incelenirken aynı çalışma slaym negatif grup içinde yapıldı ve konsantrasyon oranı artırıldığında negatif grupta da TSB' ye oranla optik yoğunluk ölçümlerinin artmış olduğu saptandı (Şekil 3). Konsantrasyonlar arasındaki farklılığında anlamlı olduğu gözlemlendi (Tablo 1). Buna bağlı olarak farklı konsantrasyonlarda Mg^{+2} içeren TSB' nin slaym pozitif ve slaym negatif gruba olan etkileri istatistiksel olarak test edildi (Tablo 2) ve bazı konsantrasyonlarının gruplar arasında farklılık gösterdiği saptandı.



Şekil 3. Farklı konsantrasyonlarda Mg^{+2} içeren TSB'de slaym pozitif ve slaym negatif *S.epidermidis* suşlarının 490nm dalga boyunda mikro ELISA okuyucusu ile saptanan optik yoğunluk ölçümlerinin kutu grafiği.

Slaym pozitif S.epidermidis							
	Normal	8µM	16µM	32µM	64µM	128µM	256µM
Normal		0,016775*	0,018678*	0,10491	0,064002	0,908155	0,092056
8µM	,014453*		0,832191	0,128343	0,132343	,005634*	,002344*
16µM	0,122837	0,172058		0,045362*	,045708*	0,000474*	,000707*
32µM	0,072626	0,122632	0,628945		0,912608	,024054*	,002359*
64µM	0,878747	,002835*	,025707*	,022935*		,018182*	,001888*
128µM	,029935*	,001870*	,012803*	,006363*	0,087936		,014063*
256µM	,046502*	,004145*	,011521*	,008495*	0,068318	0,384152	
Slaym negatif S.epidermidis							

Tablo 1. Slaym pozitif grup ve slaym negatif grupta, farklı konsantrasyonlarda Mg⁺² içeren besiyerlerinin optik yoğunluk ölçümlerinin eşleştirilmiş t – testi ile karşılaştırılması.

* Optik yoğunluk ölçümleri birbirinden istatistiksel olarak farklı olan (p<0,05) konsantrasyonlar tabloda “ * ” işareti ile gösterilmiştir.

Konsantrasyonlar		p*
Slaym (-) Örnek sayısı:13	Slaym (+) Örnek sayısı:15	
Normal	Normal	,011890*
8µM	8µM	,074942
16µM	16µM	,076492
32µM	32µM	,020779*
64µM	64µM	,104248
128µM	128µM	,026181*
256µM	256µM	,019987*

Tablo 2. Farklı konsantrasyonlarda Mg⁺² içeren TSB' nin slaym pozitif ve slaym negatif gruba olan etkilerinin bağımsız t – testi ile karşılaştırılması.

* Optik yoğunluk ölçümleri birbirinden istatistiksel olarak farklı olan (p<0,05) konsantrasyonlar tabloda “ * “ işareti ile belirtilmiştir.

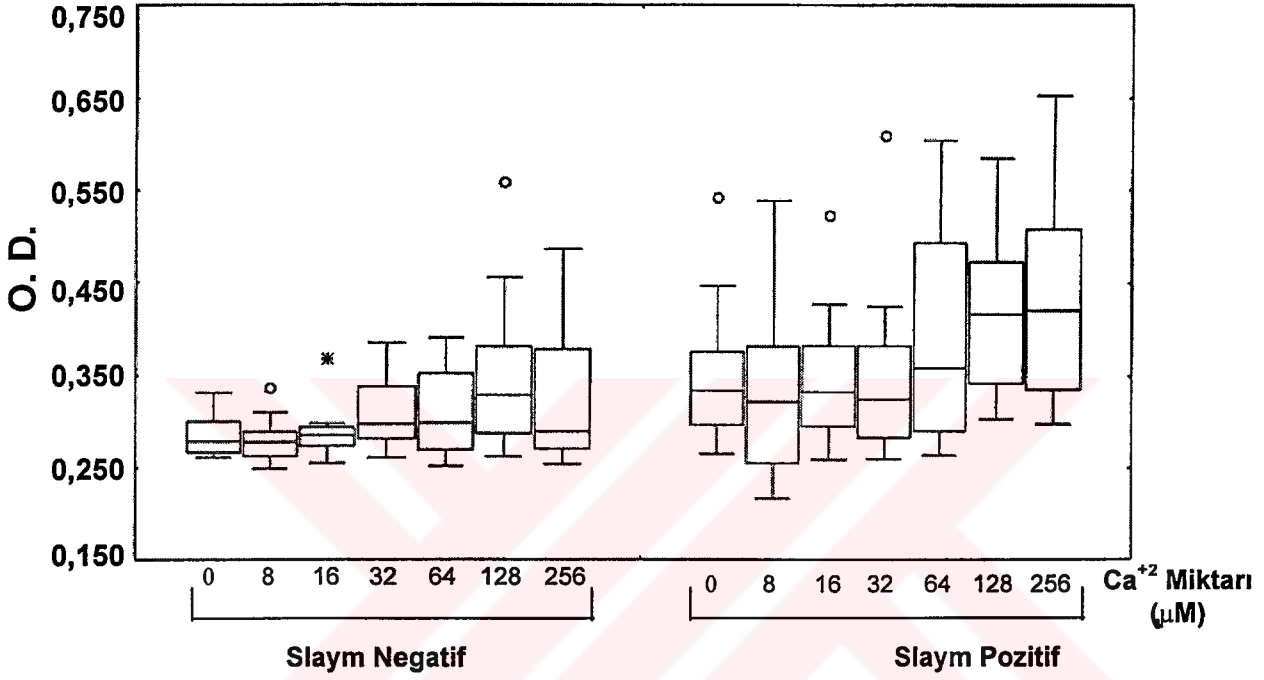
KALSİYUM

Kalsiyumun *S.epidermidis* suşlarının slaym oluşumuna etkisi incelendiğinde (Şekil 4); düşük konsantrasyonlardaki Ca^{+2} , un slaym oluşumu üzerine herhangi bir etkisi olmadığı gözlemlendi. Tıpkı Mg^{+2} , da olduğu gibi yüksek konsantrasyonlarda Ca^{+2} içeren TSB' de slaym oluşumunun arttığı saptandı. Özellikle $256\mu M$ Ca^{+2} içeren TSB, normal TSB ile karşılaştırıldığında (Tablo 3) farklılığın istatistiksel açıdan da önemli olduğu bulundu.

Ca^{+2} içeren besiyerleri kendi aralarında ele alındığında; $128\mu M$ ve $256\mu M$ Ca^{+2} içeren besiyerlerinin, $8\mu M$, $16\mu M$ ve $32\mu M$ oranlarında Ca^{+2} içeren besiyerlerinden farklı olarak slaym oluşumunu artırıcı özellik gösterdiği saptandı.

Slaym negatif grupta ise $32\mu M$ ve daha yüksek oranlarda Ca^{+2} içeren TSB' den elde edilen optik yoğunluk ölçümlerindeki artışın istatistiksel açıdan anlamlı olduğu gözlemlendi (Tablo 3).

Negatif ve pozitif gruplar farklı konsantrasyonlar açısından ele alındığında değişkenlik gösterdiği belirlendi (Tablo 4).



Şekil 4. Farklı konsantrasyonlarda Ca²⁺ içeren TSB'de slaym pozitif ve slaym negatif *S.epidermidis* suşlarının 490 nm dalga boyunda mikro ELISA okuyucu ile saptanan optik yoğunluk ölçümlerinin kutu grafiği.

Slaym pozitif S.epidermidis							
	Normal	8µM	16µM	32µM	64µM	128µM	256µM
Normal		0,386083	0,922955	0,679899	0,080071	0,059588	0,003245*
8µM	0,572504		0,261321	0,61957	0,090171	,001448*	,001620*
16µM	0,329731	0,367522		0,433984	0,298464	,043615*	,010226*
32µM	0,032377*	,038457*	0,240403		0,070593	,013254*	,001974*
64µM	,037101*	0,063571	0,10676	0,551095		0,500474	0,063042
128µM	0,005282*	,011956*	,010509*	,027355*	,027850*		0,230655
256µM	,017313*	,037127*	0,050215	0,123963	0,194393	0,335741	
Slaym negatif S.epidermidis							

Tablo 3. Slaym pozitif grup ve slaym negatif grupta farklı konsantrasyonlarda Ca⁺² içeren besiyerlerinin optik yoğunluk ölçümlerinin eşleştirilmiş t – testi ile karşılaştırılması.

* Optik yoğunluk ölçümleri birbirinden istatistiksel olarak farklı olan (p<0,05)

konsantrasyonlar tabloda “ * ” işareti ile gösterilmiştir.

Konsantrasyonlar		p*
Slaym (-) Örnek sayısı:13	Slaym (+) Örnek sayısı:15	
Normal	Normal	,011890*
8µM	8µM	,036107*
16µM	16µM	,040848*
32µM	32µM	,146601
64µM	64µM	,026765*
128µM	128µM	,064991
256µM	256µM	,016174*

Tablo 4. Farklı konsantrasyonlarda Ca⁺² içeren TSB' nin slaym pozitif ve slaym negatif gruba olan etkilerinin bağımsız t – testi ile karşılaştırılması.

* Optik yoğunluk ölçümleri birbirinden istatistiksel olarak farklı olan (p<0,05)

konsantrasyonlar tabloda “ * “ işareti ile belirtilmiştir.

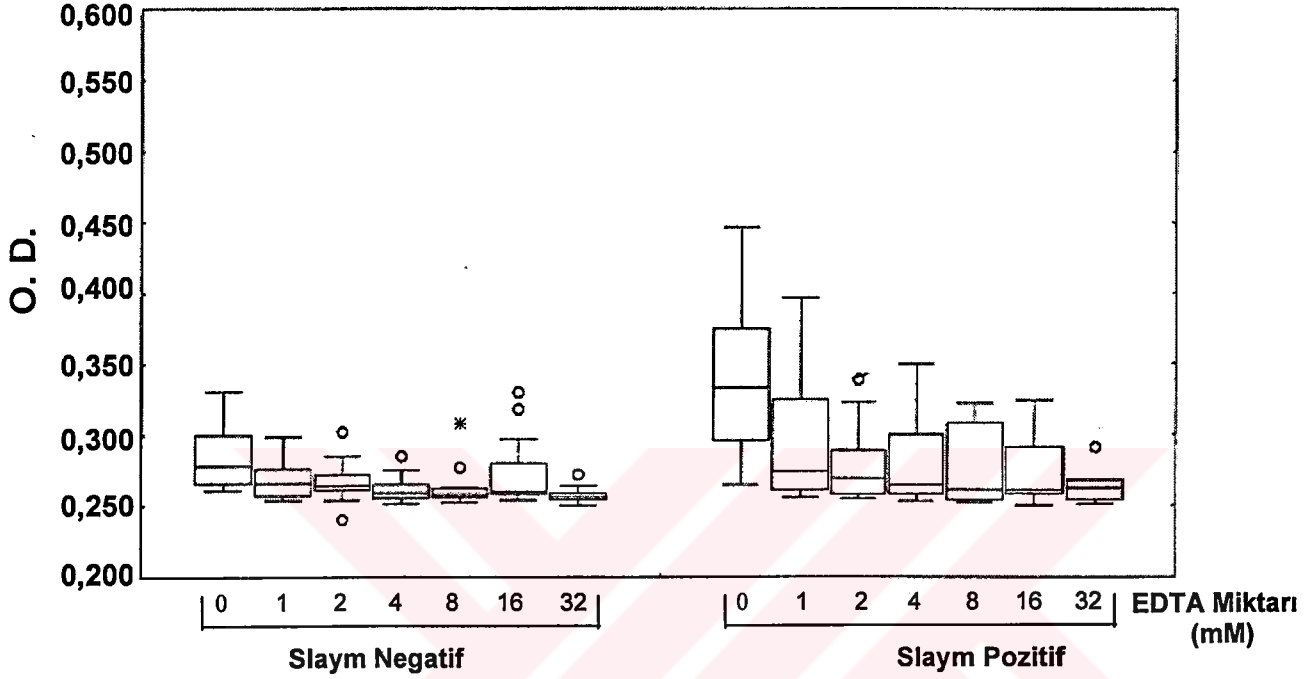
EDTA

Ca^{+2} ve Mg^{+2} , dan farklı olarak TSB' ye ilave edilen EDTA' nın çalışılan bütün konsantrasyonlarda slaym oluşumunu belirgin bir şekilde azalttığı gözlendi (şekil 5). Farklı oranlarda EDTA içeren besiyerlerinin her birinin slaym oluşumunu azaltıcı etkisinin istatistiksel açıdan da anlamlı olduğu saptandı (Tablo 5).

Konsantrasyonlar arasındaki farklılık incelendiğinde 32mM EDTA içeren TSB' nin 1mM EDTA içeren TSB' den daha fazla slaym oluşumunu azaltıcı etki gösterdiği, diğer konsantrasyonlar arasındaki farklılığın anlamlı olmadığı bulundu.

Negatif grupta da EDTA' nın etkisi incelendiğinde, pozitif grupla paralellik gösterdiği yani konsantrasyon arttığında elde edilen optik yoğunluklarda düşüş olduğu gözlendi. Tablo 5' te bu azalışın istatistiksel olarak ta anlamlı olduğu görülmektedir.

EDTA' nın tüm konsantrasyonlarda slaym pozitif ve negatif gruba olan etkilerinin benzer olduğu bağımsız t – testi ile de saptandı (Tablo 6).



Şekil 5. Farklı konsantrasyonlarda EDTA içeren TSB’de slaym pozitif ve slaym negatif *S.epidermidis* suşlarının 490 nm dalga boyunda mikro ELİSA okuyucu ile saptanan optik yoğunluk ölçümlerinin kutu grafiği.

Slaym pozitif S.epidermidis							
	Normal	32mM	16mM	8mM	4mM	2mM	1mM
Normal		,004385*	,005300*	,007745*	,012107*	,007904*	,035126*
32mM	0,028613*		0,241487	0,268084	0,088188	0,139286	,048536*
16mM	0,128612	0,249852		0,667968	0,234824	0,204648	0,073684
8mM	,005363*	0,958664	0,103808		0,448151	0,354221	0,097644
4mM	,006681*	0,886174	0,123684	0,782312		0,895156	0,194834
2mM	,024220*	0,548288	0,377989	0,471316	0,260632		0,18502
1mM	,005921*	0,423437	0,500463	0,421967	0,218256	0,835244	
Slaym negatif S.epidermidis							

Tablo 5. Slaym pozitif grup ve slaym negatif grupta farklı konsantrasyonlarda EDTA içeren besiyerlerinin optik yoğunluk ölçümlerinin eşleştirilmiş t – testi ile karşılaştırılması.

* Optik yoğunluk ölçümleri birbirinden istatistiksel olarak farklı olan ($p < 0,05$) konsantrasyonlar tabloda “ * ” işareti ile gösterilmiştir.

Konsantrasyonlar		p*
Slaym (-) Örnek sayısı:13	Slaym (+) Örnek sayısı:15	
Normal	Normal	,011890*
32mM	32mM	,414571
16mM	16mM	,912137
8mM	8mM	,151429
4mM	4mM	,063592
2mM	2mM	,171941
1mM	1mM	,053023

Tablo 6. Farklı konsantrasyonlarda EDTA içeren TSB' nin slaym pozitif ve slaym negatif gruba olan etkilerinin bağımsız t – testi ile karşılaştırılması.

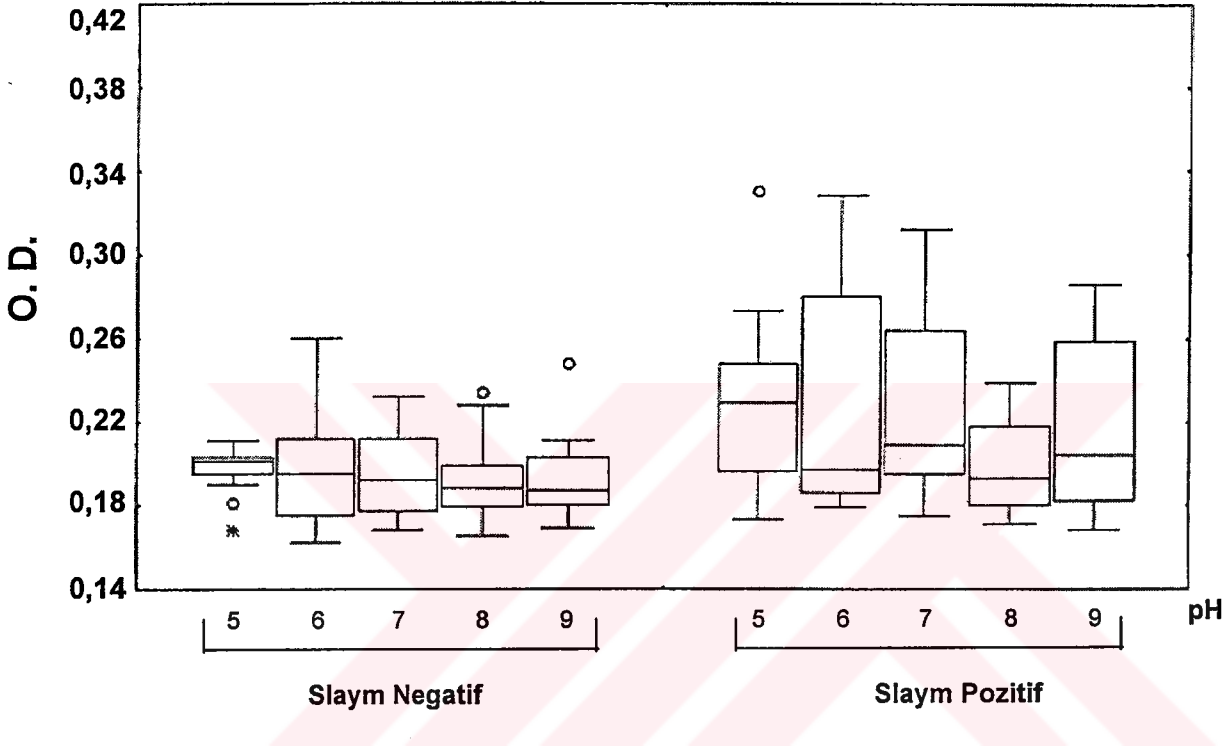
* Optik yoğunluk ölçümleri birbirinden istatistiksel olarak farklı olan ($p < 0,05$)

konsantrasyonlar tabloda “ * “ işareti ile belirtilmiştir.

pH

pH' nın slaym oluşumuna etkisini araştırmak için pH' sı 5, 6, 7, 8 ve 9 olan TSB' ler hazırlanarak incelendi. pH 7 baz alındığında diğer pH' ların slaym oluşumuna etkisinin değişkenlik gösterdiği saptandı (Şekil 6). Fakat bu değişkenliğin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulundu (Tablo 7).

Negatif grupta da pH farklılığının anlamlı bir etkisinin olmadığı saptandı. pH açısından negatif ve pozitif gruplar karşılaştırıldığında, pH' lar arasında anlamlı bir farklılık bulunmadığı belirlendi (Tablo 8).



Şekil 6. Farklı pH'lardaki TSB'de slaym pozitif ve slaym negatif *S.epidermidis* suşlarının 490nm dalga boyunda mikro ELISA okuyucusu ile saptanan optik yoğunluk ölçümlerinin kutu grafiği

Slaym pozitif S.epidermidis					
	pH5	pH6	pH7	pH8	pH9
pH5		0,482184	0,810625	0,140207	0,359781
pH6	0,83737		0,507082	0,250749	0,735548
pH7	0,909913	0,976907		0,062814	0,398009
pH8	0,242224	0,474576	0,444894		0,297307
pH9	0,325053	0,598832	0,364726	0,899138	
Slaym negatif S.epidermidis					

Tablo 7. Slaym pozitif grup ve slaym negatif grupta farklı pH' larda besiyerlerinin optik yoğunluk ölçümlerinin eşleştirilmiş t – testi ile karşılaştırılması.

* Optik yoğunluk ölçümleri birbirinden istatistiksel olarak farklı olan konsantrasyonlar tabloda “ * ” işareti ile gösterilmiştir.

Konsantrasyonlar		p*
Slaym (-) Örnek sayısı:13	Slaym (+) Örnek sayısı:15	
Normal	Normal	,011890*
pH 5	pH 5	,020752*
pH 6	pH 6	,164522
pH 7	pH 7	,062605
pH 8	pH 8	,312420
pH 9	pH 9	,061554

Tablo 8. Farklı pH' larda TSB' nin slaym pozitif ve slaym negatif gruba olan etkilerinin bağımsız t – testi ile karşılaştırılması.

* Slaym oluşturma etkisi birbirinden istatistiksel olarak farklı olan ($p < 0,05$) konsantrasyonlar tabloda “ * “ işareti ile belirtilmiştir.

TARTIŞMA

Bazı KONS suşlarının salgıladıkları slaym maddesi, bu bakterilerin yerleştikleri organizmada enfeksiyon oluşumunda önemli virulans faktörlerden biridir. Slaym özellikle insan vücuduna yerleştirilen medikal alet ve aygıtlara yapışıp enfeksiyon odağı oluşumunda önemli rolü olduğu belirlenmiştir (1, 16, 21, 63, 65). KONS'ların slaym maddesi salgılayan suşlarının vücuda yerleştirilen medikal alet ve aygıtlarda kolonize olması bu bakterilerin adezyon özelliklerine bağlıdır. Araştırmacılar tarafından primer adezyon olarak adlandırılan bu ilk etap aslında slaym negatif ve slaym pozitif bakteriler tarafından gerçekleştirilir. Adezyon özelliği bu bakteri suşlarının hücre duvar yapılarının fiziko-kimyasal özelliklerine göre güçlü ve zayıf olabildiği gibi, ortamın zeta potansiyeli, plasma proteinlerinin bulunuşu ve bakterilerin yüzey özelliklerine de bağlıdır (8, 11, 12, 13, 21, 45).

Adezyonun gerçekleşmesi, kolonizasyon ve slaym oluşumu, ortam koşullarına ve bakterinin slaym üretme kapasitesine bağlıdır. Adezyon özelliği bulunan slaym pozitif *S.epidermidis* suşları slaym nedeniyle daha kararlı kolonizasyonlar oluşturdukları, immünolojik tepkimelere ve antibiyotiklere direnç gösterdikleri için bu bakterilerin eliminasyonu adezyon özelliği bulunan slaym negatif suşların eliminasyonundan daha güçtür (6, 19, 35, 45, 46).

Çalışmamızda, in vitro yöntem kullanarak iki değerlikli katyonların (Mg^{+2} , Ca^{+2}) artan konsantrasyonlarda slaym pozitif izolatların slaym üretimini, kontrol değerlerine göre önemli ölçüde artırmış olduğunu tespit ettik. İki değerlikli katyonların *S.epidermidis*'in slaym oluşumunu niçin artırdığı mekanizması araştırmacılar tarafından tam açıklanamamıştır. Örneğin bazı araştırmacılar ortamdaki iki değerlikli katyonların hücre yüzeyine bağlanmak suretiyle, sınırlı bir yüzeye çok sayıda mikroorganizmanın yapışmasını sağlayarak, bakteriyel kümeleşmeyi artırdığını ileri sürmektedir. Ortamdaki iki

değerlikli katyonların hücre yüzeyindeki anyonik makromoleküllere bağlanarak bakterinin yüzeyi ile negatif yüklü plastik yüzey arasındaki elektrostatik itmeyi azalttıklarını bildirmişlerdir. Bu teoriyi birçok araştırmacı desteklemiştir (13, 22, 42). Bu araştırmacılar Gram pozitif hücre duvarındaki teikoik asidin, hücredeki iyon değişimini ve girişini özellikle Mg^{+2} 'un hücre içine girişini kontrol ettiğini rapor etmişlerdir. Lambert ve arkadaşları (42), hücre duvarındaki bitişik teikoik asit zincirleri arasında Mg^{+2} bantlarının oluştuğunu, Heptinstall' de (32) teikoik asidin Gram pozitif bakterilerin yüzeylerindeki negatif yük ağının korunmasından sorumlu olduğunu ve bu negatif yükün de bakterilerin diğer bakterilerle veya diğer partiküllerle kümeleşmesini önlediğini tespit etmişlerdir. Bu bilgiler doğrultusunda Dunne ve arkadaşları (21) böyle bir ortamda bulunan serbest iki değerlikli katyonların bakteri yüzeyindeki negatif yüklere bağlanarak hücreler arasındaki elektrostatik itmeyi azaltıp, hücreler arası yapışmayı ve hücrenin yüzeye yapışmasını artırdığını açıklamışlardır.

Çalışmamızda Mg^{+2} ve Ca^{+2} 'un slaym pozitif *S.epidermidis* suşlarının slaym oluşturmaları üzerine etkilerini TSB'de gittikçe artan konsantrasyonlarda Mg^{+2} ve Ca^{+2} ilavesi ile inceledik. Mg^{+2} 'un düşük konsantrasyonlarda ($8\mu M$, $16\mu M$) slaym oluşumunu artırmayıp aksine azaltıcı bir etki gösterdiğini saptadık. $128\mu M$ ve $256\mu M$ Mg^{+2} içeren TSB'de ise slaym oluşumunun artmış olduğunu gözledik. Ancak bu artış ve azalışın tek başlarına istatistiksel olarak normal TSB ile karşılaştırıldığında anlamlı olmadığını saptadık (Tablo 1). Bunun yanı sıra farklı oranlarda Mg^{+2} ve Ca^{+2} içeren besiyerleri konsantrasyonlarına bağlı olarak karşılaştırıldığında, artan Mg^{+2} ve Ca^{+2} konsantrasyonlarının slaym oluşumunu artırmış olduğunu gördük. Mg^{+2} ve Ca^{+2} 'un artan konsantrasyonlarının slaym oluşumunun da artmış olduğunu istatistiksel olarak da tespit ettik.

Farklı konsantrasyonlardaki Mg^{+2} ve Ca^{+2} 'un slaym pozitif grupta slaym oluşumuna etkisini incelerken aynı çalışma slaym negatif grup için de yapıldı. Konsantrasyon oranı arttıkça negatif grupta da TSB' ye oranla optik yoğunluk ölçümlerinin anlamlı bir şekilde artmış olduğunu gözledik.

Dunne ve arkadaşları (21) beş slaym pozitif ve bir slaym negatif *S.epidermidis* suşuyla yaptıkları çalışmalarında, slaymın ilk basamağı olan adezyonu Ca^{+2} ve Mg^{+2} katyonlarının benzer şekilde artırmış olduğunu bildirmişlerdir. Magnezyumun slaym oluşumuna etkisinin Ca^{+2} 'a göre daha fazla olduğunu bildirirken, bunu *S.epidermidis* hücre duvarı komponentlerinin iki değerlikli katyonlara olan affinite farklılığı ile açıklamışlardır. Lambert ve arkadaşları (42) da daha önceki bir çalışmalarında ortamda daha fazla Ca^{+2} olmasına rağmen *S.epidermidis*'in ortamdaki Mg^{+2} u seçici olarak aldığını göstermişlerdir.

Mg^{+2} , Ca^{+2} ve diğer eser katyonların bakteriyel eksopolisakkaritleri benzer bir madde içinde polimerize ederek hücrenin hücreye ve hücrenin yüzeye bağlanmasını artırdığı bilinmektedir. Bilinen diğer bir mekanizmada iki değerlikli katyonların yapışma ve kümeleşmeyi artırdığıdır (21, 32, 42).

1979 yılında Sugarman (62) *S.epidermidis*' ten farklı olarak *Klebsiella pneumonia*, *Proteus mirabilis* ve *Escherichia coli* bakteri suşlarının adezyonu üzerine bazı ağır metallerin etkisini incelemişlerdir. Demir ve çinko'nun bu bakterilerin ortamdaki hücrelere yapışmalarını artırıcı etkisini gözlerken, ortamdaki Ca^{+2} ve Mg^{+2} 'un benzer etkisini tespit edememişlerdir. Sugarman çalışmasında ortamdaki demir konsantrasyonunun adezyonu artırıcı etkisinin yanında bu bakterilerin üremelerini de artıran bir metal olduğunu bildirmiş ve enfeksiyon gelişiminde ortamdaki demir konsantrasyonunun önemli olduğunu vurgulamıştır.

Deighton ve Borland (17) *S.epidermidis* suşlarının slaym üretim kapasitelerinin ortamdaki demir konsantrasyonu ile ilişkilerini incelediklerinde, slaym negatif

S.epidermidis suşlarının EDDA ile zenginleştirilip demir konsantrasyonunun düşürüldüğü ortamlarda slaym üretim kapasitelerinin arttığını gözlemlemişlerdir.

Elçi ve arkadaşlarının (24) yaptığı çalışmada *S.epidermidis* suşları slaym üretim kapasitelerine göre güçlü, orta, zayıf ve negatif olmak üzere dört gruba ayrılmıştır. Bu dört farklı *S.epidermidis* suş grubunun slaym üretim kapasiteleri farklı demir konsantrasyonlarında ve farklı zaman aralıklarıyla ölçülmüştür. Enkübasyon ortamı olarak kullanılan TSB' ye değişik miktarlarda demir bağlama özelliği olan EDDA maddesi ilave edilmiştir. Bu şekilde iki farklı konsantrasyonda demir limitasyonu sağlanmıştır. TSB kontrol olmak üzere üç farklı ortam oluşturulmuştur. Slaym üretim kapasiteleri ölçülerek; demir konsantrasyonunun düşürülmesine bağlı olarak slaym üretiminin artmış olduğu gösterilmiştir. Fakat bu artışların, kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmadığı bildirilmiştir.

Slaym pozitif *S.epidermidis* suşlarının slaym oluşturma kapasiteleri üzerine EDTA'nın etkisini incelediğimizde; Ca^{+2} ve Mg^{+2} , dan farklı olarak TSB'ye ilave edilen EDTA'nın çalışılan bütün konsantrasyonlarda slaym oluşumunu belirgin bir şekilde azalttığını belirledik. Konsantrasyonlar arasındaki farklılık incelendiğinde 32 mM EDTA içeren TSB'nin 1 mM EDTA içeren TSB'den daha fazla slaym oluşumunu azaltıcı etki gösterdiği, diğer konsantrasyonlar arasındaki farklılığın anlamlı olmadığı saptandı. Negatif grupta da EDTA'nın etkisi incelendiğinde, pozitif grupla paralellik gösterdiği yani konsantrasyon arttığında elde edilen optik yoğunluklarda düşüş olduğu gözlemlendi.

Dunne ve arkadaşları (21) yaptıkları çalışmada iki değerlikli katyonların aksine, EDTA'nın konsantrasyona bağlı olarak slaym üretiminde, çalıştıkları tüm suşlarda belirgin bir düşüş olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar, çalışmamız sonuçları ile paralellik gösteren verilerinin iki değerlikli katyonlar için açıklanan teoriyi desteklediğini belirtmişlerdir. EDTA'nın ortamda serbest olarak bulunan iki değerlikli katyonları bağlama

özelliği bulunduğu bilinmektedir. Bu özellikleri de *S.epidermidis*'in slaym üretimi kapasitesi üzerine olan azaltıcı etkilerini açıklamaktadır.

pH' nın slaym pozitif *S.epidermidis* suşlarının slaym üretme kapasiteleri üzerine etkisini gözlemek için, pH' sı 5, 6, 7, 8 ve 9 olan TSB' ler hazırladık. pH 7'yi baz alarak pH' nın slaym oluşumu üzerine etkisini değerlendirdik. pH' nın slaym oluşumuna etkisinin kısmen de olsa değişkenlik gösterdiğini ancak bu değişkenliklerin istatistiksel olarak anlamsız olduklarını saptadık.

Yapılan bir çalışmada slaym pozitif *S.epidermidis* suşlarının slaym üretim kapasiteleri üzerine pH' nın etkili olduğu bildirilmiştir. Çalışmada bütün slaym pozitif suşların slaym oluşturma kapasitelerinin asidik ortamda düştüğünü, alkali ortamda ise beş suştan ikisinin slaym üretme kapasitelerinde artış olduğu belirtilmiştir. pH' nın bu etkisinin muhtemelen toplam yüzey yüküyle ilgili olduğu ve bu yükün hücre yüzeyi ve elektronegatif madde arasındaki çekim gücünü kontrol ettiği bildirilmektedir (21).

Biz çalıştığımız iki değerlikli (Ca^{+2} , Mg^{+2}) katyonların slaym pozitif tüm suşlarda slaym üretim kapasitesini in vitro olarak artırdığını gördük. İki değerlikli katyonların aksine EDTA'nın slaym üretim kapasitesi üzerine olumsuz etkisini gözledik. Çalıştığımız tüm slaym pozitif suşlarda EDTA'nın slaym üretimini baskılayıcı bir rolü olduğunu saptadık. EDTA'nın ortamda serbest olarak bulunan iki değerlikli katyonları bağlama özelliğinden kaynaklandığı kanısına vardık.

KONS' ların slaym maddesini üretmeleri klinik olarak önemli bir virulans faktördür. Özellikle metabolik bozukluklara sahip ve maligniteli hastalarda *S.epidermidis* gibi fırsatçı patojenlerin infeksiyon yapma sıklığı sağlıklı bireylere göre daha yüksektir. Bu tip hastalarda immünosupressif ilaç kullanımı, hiperkalseminin yüksek oranda görülmesi, yüksek konsantrasyonlarda katyon içeren intravenöz solüsyonların alınımı ve lokal enflamasyon gibi sebeplerin hastalarda bakteriyel adezyon artışına neden olabileceğini

düşündürmektedir. Örneğin yüksek konsantrasyonlarda iki değerlikli katyon içeren intravenöz solüsyonlarının hastaya verilmesi esnasında bu katyonların kateter bölgesindeki moleküllerin çekim gücünü arttırıp, *S.epidermidis* gibi fırsatçı mikroorganizmaların birbirlerine ve ortama adezyonunu arttırıp kolonizasyonu yükseltebileceği bildirilmiştir (22). Çalışmamızı çeşitli metabolik bozukluğu olan ve maligniteli hastalarda slaym üreten bakteriyel enfeksiyonlarının önemini belirleyecek çalışmalar için bir ön araştırma olarak değerlendirilebilir.



ÖZET

Çeşitli klinik örneklerden izole edilen 15 slaym pozitif *Staphylococcus epidermidis* suşunun slaym oluşturma kapasitesi üzerine kalsiyum (Ca^{+2} , kalsiyum klorür olarak kullanıldı), magnezyum (Mg^{+2} , magnezyum sülfat olarak), EDTA (Etilen diamin tetraasetik asit) ve pH'nın etkisi kantitatif mikro yöntem kullanılarak test edildi. Mg^{+2} ve Ca^{+2} 'un slaym oluşumuna etkisi, TSB'de gittikçe artan konsantrasyonlarda (8 μ M, 16 μ M, 32 μ M, 64 μ M, 128 μ M, 256 μ M) Mg^{+2} ve Ca^{+2} ilavesi ile incelendi. Farklı oranlarda Mg^{+2} ve Ca^{+2} içeren besiyerleri konsantrasyonlarına bağlı olarak karşılaştırıldığında Mg^{+2} ve Ca^{+2} 'un artan konsantrasyonlarının slaym oluşumunu artırmış olduğu gözlemlendi. Aynı çalışma slaym negatif grup için de yapıldı ve konsantrasyon oranı artırıldığında negatif grupta da TSB'ye oranla optik yoğunluk ölçümlerinin arttığı gözlemlendi. Konsantrasyonlar arasındaki fark anlamlı bulundu ($p < 0.05$). Mg^{+2} ve Ca^{+2} etkisinin aksine, TSB'ye ilave edilen EDTA'nın çalışılan bütün konsantrasyonlarında (1 mM, 2 mM, 4 mM, 8 mM, 16 mM, 32 mM) slaym oluşumunu azaltıcı etkisi saptandı. Negatif grupta da EDTA'nın etkisi incelendiğinde, pozitif grupla paralellik gösterdiği yani konsantrasyon arttığında elde edilen optik yoğunluk ölçümlerinde anlamlı bir düşüş olduğu görüldü ($p < 0.05$). pH'nın slaym oluşumuna etkisini araştırmak için pH'sı 5, 6, 7, 8 ve 9 olan TSB'ler hazırlanarak incelendi, pH 7 baz alınarak değerlendirildiğinde pH'nın slaym oluşumuna etkisinin değişkenlik gösterdiği gözlemlendi. Fakat bu değişkenliğin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptandı. Çalışmamızda in vitro olarak *S.epidermidis*'in slaym oluşumu üzerine Ca^{+2} ve Mg^{+2} 'un etkili olabileceği tespit edilmiştir. Bu *S.epidermidis*'in neden olduğu biomedikal implant enfeksiyonlarının patogenezinde önemlidir.

SUMMARY

The effects of increasing concentrations of magnesium (Mg^{2+}), calcium (Ca^{2+}), EDTA and pH on the slime production of fifteen slime positive strains of *Staphylococcus epidermidis* were examined, using an in vitro quantitative micro method. The addition of Mg^{2+} to the bacterial suspension in increasing concentrations significantly enhanced the slime production of slime positive *S.epidermidis* strains. Similarly, the addition of Ca^{2+} in increasing concentrations produced a significant increase in the slime production of all test strains. In contrast, the slime production of all test strains was significantly reduced in the presence of EDTA at increasing concentrations. The effect of pH was variable between all test strains when compared to control values at pH 7.0, but this variability is not significant statistically. These data indicate that, in addition to hydrophobic interactions, ligand-specific binding, pH and divalent cations are important determinants of the slime production of *S.epidermidis* in vitro. This has possible implications in the pathogenesis of biomedical implant infections caused by these organisms.

LİTERATÜRLER

1. Arvaniti A ve ark. Isolating and characterization of a novel 20kda sulfated polysaccharide from the extracellular slime layer of *Staphylococcus epidermidis*. Arc biochem biophys. 432 –8, 1994
2. Aybay C ve ark. Bir *Staphylococcus epidermidis* suşundan elde edilen slime maddesinin insan periferik kan mononükleer hücrelerden tümör nekroz faktörü (tnf) ve interferon gamma (ıfn-8) salgılanması üzerine etkisi. Mikrobiol bült. 30: 139 – 46, 1996
3. Aybay C, Çağlar K, İmir T. *Staphylococcus epidermidis* kaynaklı slaym maddesinin makrofajlardan nitrik oksit salgılanmasına etkisi. İnfeksiyon dergisi 11(4): 353–356, 1997
4. Bakter LP, Simpson WA, Christensen DG. Differential production of slime under: aerobic and anaerobic conditions. J.Clin. Mic. 28(11): 2578–79, 1990
5. Baselga R ve ark. Phase variation of slime production in *Staphylococcus aureus*: implication in colonization and virulence. Infection and immunity 61(11): 4857–62, 1993
6. Bayston R, Compton C, Richards K. Production of extracellular slime by coryneforms colonizing hydrocephalus shunts. J. Clin Mic. 32(7): 1705–1709, 1994.
7. Bayston R, Penny SR. Excessive production of mucoid substances in *Staphylococcus* S11A: a possible factor in colonization of holter shunts. Dev. Med. Child Nevrol. 14(27): 25 – 28, 1972
8. Bayston R, Rodgers J. Production of extra-cellular slime by *Staphylococcus epidermidis* during stationary phase of growth: Its association with adherence to implantable devices. J Clin Pathol 43: 866 – 70, 1990
9. Bilgehan H. Klinik mikrobiyolojik tanı: barış yayınları 1.baskı: 448 – 457, 1992
10. Callaghan RP, Cohen SJ, Stewart GT. Septicemia due to colonization of Spitz holter valves by staphylococci. five cases treated with methicillin. Br. Med. J. 1: 860 – 863, 1961
11. Christensen CD, Simpson WA, Binso AL. Beachey EH. Adherence of slime producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. Infec. Immun 37: 318 – 26, 1982

12. Christensen GD, Baddour IM, Simpson WA. The role of adherence in the pathogenesis of coagulase-negative staphylococcal infections pathogenicity and clinical significance of coagulase-negative staphylococci, Zbl. Bact. Suppl 16: 103 – 111, 1987
13. Chugh TD ve ark. Adherence of *Staphylococcus epidermidis* to fibrinplatelet clots in vitro mediated by lipoteichoic acid. Infect. Immun. 58: 315 – 319, 1990
14. Costerton JW, Irvin RT. The bacterial glycocalyx in nature and disease. A Rev. Microbiol. 35: 299 – 324, 1981
15. Çelebi İ, Gülay Z. Üretra kateterlerine bakteri tutunması. İnfeksiyon dergisi 12(2): 143 – 146, 1998
16. Davenport DS ve ark. Usefulness of a test for slime production as a marker for clinically significant infections with coagulase-negative staphylococci. J.In.Dis. 153(2): 332 – 338, 1986
17. Deighton MA, Borland R. Regulation of slime production in *Staphylococcus epidermidis* by iron limitation. Infection and immunity 61 (10) : 4473 – 79, 1993
18. Deighton MA, Balkau B. Adherence measured by microtiter assay as a virulence marker for *Staphylococcus epidermidis* infections. J.Clin.Mic. 28 (11) : 2242, 1990
19. Deighton MA, Borland R, Capstick JA. Virulence of *Staphylococcus epidermidis* in a mouse model: significance of extracellular slime. Epidemiol infect. 117: 267 – 280, 1996
20. Drewry DT ve ark. Staphylococcal slime: a cautionary tale. Journal of clinical microbiology 28(6): 1292 – 1296, 1990
21. Dunne MJR, Burd ME. The effects of magnesium, calcium, edta and ph on the in vitro adhesion of *Staphylococcus epidermidis* to plastic. Microbiol. Immunol 36(10): 1019 – 1027, 1992
22. Dunne MJR, Burd ME. In vitro measurement of the adherence of *Staphylococcus epidermidis* to plastic by using cellular urease as a marker. Applied Environ Microbiol 57: 863 – 866, 1991
23. Durmaz G ve ark. Topikal klindamisin kullanımının koagülaz-negatif stafilokoklarda slime yapımı, kristal viyole reaksiyonu ve direnç gelişimine etkisi. İnfeksiyon dergisi 11(1): 33 – 36, 1997
24. Elçi S, Atmaca S, Gül K. Effect of iron limitation on the amount of slime produced by strains of *Staphylococcus epidermidis*. Cytobios 84: 141 – 146, 1995

25. Elçi ve ark. Koagülaz-negatif stafilokoklarda makro ve mikro yöntemle “slime” oluşumunun saptanması ve antibiyotik direncinin araştırılması. *İnfeksiyon dergisi* 10(3): 203 – 206, 1996
26. Eykyn SJ, Grandsen WR, Phillips I. The causative organisms of septicemia and their epidemiology. *J. Antimicrob. Chemother.* 25 (suppl. C) : 41 – 58, 1990
27. Freeman DJ, Foalkiner FR, Keane LT. New method for detecting slime production by coagulase-negative staphylococci. *J Clin Pathol*, 42: 872 – 74, 1989
28. Gemmel CG. Pathogenicity of coagulase-negative staphylococci with respect to the nature of the host response. *Zbl. Bact. Hyg* 266: 52 – 59, 1987
29. Gordon D ve ark. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *Journal of clinical microbiology* 22(6): 996 – 1006, 1985
30. Gray ED, Peters G, Versteegen M, Regelman WE. Effect of extracellular slime substance from *Staphylococcus epidermidis* on the human cellular immune response. *Lancet* 365 – 367, 1984
31. Hedin G. A Comparison of methods to determine whether clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis* from the same patient are related. *Journal of hospital infection* 34: 31 – 42, 1996
32. Heptinstall S. ve ark. Teichoic acids and membrane function in bacteria. *Nature* 225: 519 – 524, 1970
33. Hoqt HA ve ark. Adhesion of coagulase-negative staphylococci to biomaterials. *Journal of general microbiology.* 129: 2959 – 68, 1983
34. Hselm E, Etherden IL. Slime production by *Staphylococcus saprophyticus*. *Infection and immunity* 59(1): 445 – 448, 1991
35. Hussain M ve ark. Importance of medium and atmosphere type to both slime production and adherence by coagulase-negative staphylococci. *Journal of hospital infection* 20: 173 – 184, 1992
36. Hussain M, Wilcox MH, White PJ. The slime of coagulase-negative staphylococci: biochemistry and relation to adherence. *Fems microbiology* 191 – 208, 1993
37. Johnson GM ve ark. Inference with granulocyte function by *Staphylococcus epidermidis* slime. *Infect. Immun* 54: 13 – 20, 1986
38. Kiraz N. Koagülaz negatif stafilokokların slaym oluşumuna etkileri. *Türk Mik. Cem. Derg.* 23: 219 – 225, 1993

39. Kloos WE, Jorgenssen JH. Staphylococci: in manual of clinical microbiology 4th edn, 143 – 153, 1985
40. Kloos WE, Lambe DW. Staphylococcus . A Balows Manuel of Clinical Mic. 1991
41. Kotilainen P ve ark. Immunochemical analysis of the extracellular slime substance of *Staphylococcus epidermidis*. Eur J C M Infect Dis 9: 262 – 270, 1990
42. Lambert PA ve ark. The interaction of magnesium ions with teichoic acid. Biochem J. 149(3): 519 – 24, 1975
43. Lowy FD, Hammer MS. *Staphylococcus epidermidis* infections. Annals of internal medicine 99(6): 834 – 839, 1983
44. Ludwicka A ve ark. Investigation on extracellular slime substance produced by *Staphylococcus epidermidis*. Zbl Bact Hyg 258: 256 – 67, 1984
45. Mack D, Siemssen N, Laufs R. Parallel induction by glucose of adherence and a polysaccharide antigen specific for plastic-adherent *Staphylococcus epidermidis*: evidence for functional relation to intercellular adhesion Infection and immunity 60(5): 2048 – 2057, 1992
46. Magued A ve ark. Association of slime with pathogenicity of coagulase-negative staphylococci causing nosocomial septicemia. Journal of clinical microbiology 22(6): 1025 – 29, 1985
47. Marples RR, Richardson JF. Characters of coagulase-negative staphylococci collected for a colaborative phape-typing studyin: staphylococci and staphylococcal infections, Zbl Bact. Suppl 10: 175 – 180, 1981
48. Mulkey MW ve ark. An in vitro model for studying the effects of slime and nonslime-forming *Staphylococcus epidermidis* contamination of intravenous catheters. The American Surgeon 58(4): 220 – 4, 1992
49. Noble MA, Grant SK, Hajen E. Characterization of a neutrophil-inhibitory factor from clinically significant *Staphylococcus epidermidis*. J.infect dis 162: 909 – 913, 1990
50. Noble WC, Naidoo J. Coagulase-negative staphylococci as skin commensals J. Med. Microbiol 22: 287, 1986
51. Nourizadeh E, Sultan N. Koagülaz-negatif stafilokoklarda slaym faktör yapımının çeşitli yöntemlerle gösterilmesi. İnfeksiyon dergisi 7(1-2): 31 – 34, 1993
52. Patrick CC. ve ark. Role of the *Staphylococcus epidermidis* slime layer in experimental tunnel tract infections. Infection and immunity 60(4): 1363 – 1367, 1992
53. Perez – Giraldo C ve ark. Influence of the incubation atmosphere on the production of slime by *Staphylococcus epidermidis*. Eur JCM Infect Dis. 14: 359 – 362, 1992

54. Peters G, Gray ED, Johnson GM. Immunomodulating properties of extracellular slime substance. Infections associated with indwelling medical devices. 61 – 74, 1988
55. Peters G, Locci R, Pulverer G. Adherence and growth of coagulase-negative staphylococci on surfaces of intravenous catheters. Infect. Dis. 146: 479 – 482, 1982
56. Peters G. ve ark. Biology of *S.epidermidis* slime. Pathogenicity and clinical significance of coagulase-negative staphylococci Zbl. Bact. Suppl. 16: 15 – 32, 1987
57. Peters G. New considerations in the pathogenesis of coagulase-negative staphylococcal foreign body infections. Antimicrob agents chemother 21: 139 – 148, 1988
58. Pfaller M ve ark. Development of the quantitative micro-test for slime production by coagulase-negative staphylococci. Eur JCM Infect Dis. February: 30 – 33, 1988
59. Riley TV, Schneider FP. Infrequency of slime production by urinary isolates of *Staphylococcus saprophyticus*. Journal of infection 24: 63 – 66, 1992
60. Smith IM, *Staphylococcus epidermidis* septicemia :1974 – 1978 compared to 1949 – 1958 in: staphylococci an staphylococcal infections. Gustav fischen verlas 765-772,1981
61. Songur M ve ark. Association of slime production and differnt incubation conditions of coagulase-negatif staphylococci. Turkish journal of infection 12(1):29-33: 1998
62. Sugarman B. Effect of heavy metals on bacterial adherence. J.Med. Microbiol 13:351-354,1980
63. Teichman JMH ve ark. Quaternary amine (protamine sulfate) is bactericidal to *Staphylococcus epidermidis* 1967(6): 1500-1501, 1993
64. Timmerman CP ve ark. Characterization of a proteinaceous adhesin of *Staphylococcus epidermidis* which mediates attechment to polystrene. Infect. Immun. 59: 4187 – 4192, 1991
65. Younger JJ ve ark. Coagulase-negative staphylococci isolated from cerebrospinal fluid shunts : importance of slime production, species identification and shunt rimoval to clinical outcome. J. Infect Dis. 156: 548 – 554, 1987