

“Slime” Oluşumu ve Bunun Rol Oynadığı Bakteri Aderansında Muhtemel Anahtar Molekül: Sialik Asid

Serhan Sakarya¹, Serkan Öncü¹, Selcen Öncü², Barçın Öztürk¹, Günay Tuncer- Ertem³, Cavide Sarı⁴

Özet: “Slime” oluşturan koagülaz-negatif stafilokokların sialik asid içeriğinin, “slime” oluşumu ve kateter, protez gibi implante edilmiş materyallere aderansındaki rolü in vitro olarak çalışıldı. Bakterinin düzgün sentetik yüzeylere aderansı ve “slime” oluşturma miktarı, bakteri artan dozlarda *Clostridium perfringens*’ten elde edilmiş nöraminidaz ile muamele edilecek kantitatif yöntemlerle belirlendi. “Slime” oluşturan koagülaz-negatif bakterilerin stafilokokların nöraminidaz ile 100 mU/ml ve üzerindeki dozlarda muamelesi sonucu doza bağımlı olarak azaldığı görüldü ($p<0.001$). Bu bulgular, sialik asidin “slime” yapısında bulunduğunu ve bakterinin inert yüzeylere aderansında rol oynadığını göstermektedir.

Anahtar Sözcükler: Bakteri aderansı, sialik asid, nöraminidaz, slime, koagülaz-negatif stafilokoklar.

Summary: Sialic acid, probable key molecule for slime formation and its role on bacterial adherence. The role of sialic acid on slime formation and adherence of slime-forming coagulase-negative staphylococci to inert surface were studied in vitro. The quantitative biofilm assay and bacterial adherence to smooth surfaces were performed with increasing concentrations of neuraminidase extracted from *Clostridium perfringens* treated bacteria. Slime production of slime-forming coagulase-negative staphylococci at (100 mU/ml ($p<0.001$) decreased with further dose-dependent decrement at 300 mU/ml. These results indicate that, sialic acid is a constituent molecule of the slime and involved in bacterial adherence to inert surface.

Key Words: Bacterial adherence, sialic acid, neuraminidase, slime, coagulase-negative staphylococci.

Giriş

İnsan normal florasında yoğun olarak bulunan koagülaz-negatif stafilokoklar (KNS) sıklıkla, morbidite ve mortaliteyle seyreden hastane infeksiyonları oluşturmaktadır (1,2). KNS, özellikle kateter, protez implant, kalp kapak protezleri, hemodiyaliz ve serebrospinal şant gibi implante edilmiş tıbbi cihazların infeksiyonlarında en sık sorumlu olan bakterilerdir (1-3). Buna ek olarak, altta yatan ciddi hastalığı olan ve immünosüprese hastalarda da en sık izole edilen etken olarak karşımıza çıkmaktadır (4).

Stafilokokların biyomateryallerde nasıl infeksiyon oluşturdularının patojenik mekanizmaları uzun yıllardır araştırılmaktadır (5,6). Son yıllarda yapılan çalışmalarda KNS'nin inert materyallere aderansının başlangıç basamağında polisakarid tabiatındaki “slime” yapısının önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir (1,6,7). Bunun dışında “slime” yapının bakteri fagositozunu zorlaştırdığı ve özellikle glikopeptid gibi makromolekül antibiyotiklere direnci artırdığı bildirilmiştir (8-11).

Her ne kadar “slime” yapısında glikoproteinlerin, peptidoglikanların ve polisakaridlerin bulunduğu tespit edilmişse de

kesin kimyasal yapısı halen açıklanamamıştır (12). Diğer yandan “slime” in karbonhidrat yapısının bakteri aderansında önemli rol oynadığı tespit edilmiştir (13,14).

Sialik asid, mikroorganizmalar, vertebralılar ve memelilerin dokularında yapısal olarak bulunan bir karbonhidrattır. Bu şeker canlı hücrelerinde glikokonjugatlar olarak bulunup, hücre yüzeyinde negatif elektrik şarjı sağlar. Ökaryot hücre yüzeyindeki sialik asid hücreler arası ilişkide önemli determinant olup sialasyonun biyolojik sistemlerde düzenleyici bir etkisi vardır. Membranla ilişkili olarak bulunan sialik asidin hücre deformabilitesi, aderansı ve motilitesi gibi önemli özellikleri üzerinde belirleyici etkisinin olduğu bilinmektedir (15-17). Sialik asidin hücre yüzeyindeki miktarı nöraminidaz ve sialotransferaz enzimleri aracılığıyla ayarlanmaktadır.

Biz, halen tam olarak yapısı belirlenememiş “slime” in bakteriye kazandırdığı özellikler göz önüne alındığında yapıdaki sialik asidin fonksiyonel bir molekül olabileceğini düşündük. Bu hipotezimizi kanıtlamak için sialik asidin KNS’de in vitro “slime” üretimi ve bakteri aderansındaki rolünü araştırdık.

Yöntemler

Bakteri suşları: Çalışmada kateter infeksiyonu olan hastalardan izole edilen KNS kullanıldı. İzolatların idantifikasyonu Gram boyaması, katalaz reaksiyonu, tüp koagülasyon testi gibi klasik yöntemlerle yapıldı.

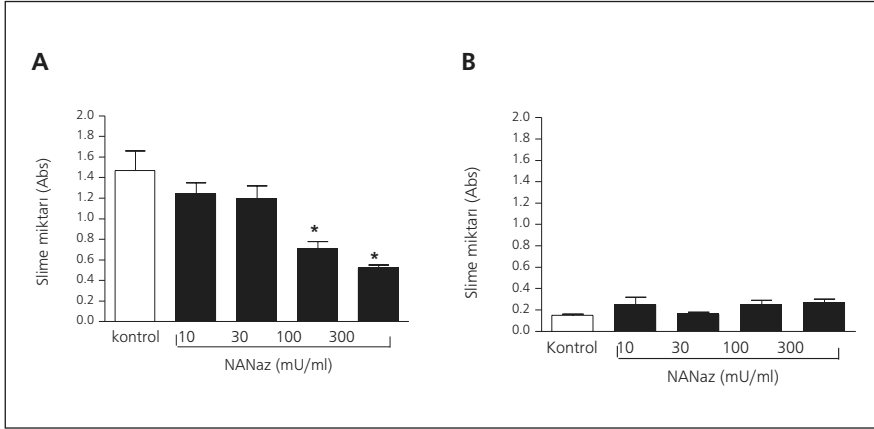
Kantitatif biyofilm (“slime”) oluşturma deneyi: İzole edilen KNS “slime” oluşturup oluşturmadıkları daha önce O’Tooler (18) tarafından bildirilen teknik kullanılarak araştırıldı.

(1) Adnan Menderes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Aydın

(2) Adnan Menderes Üniversitesi, Bilim Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi, Aydın

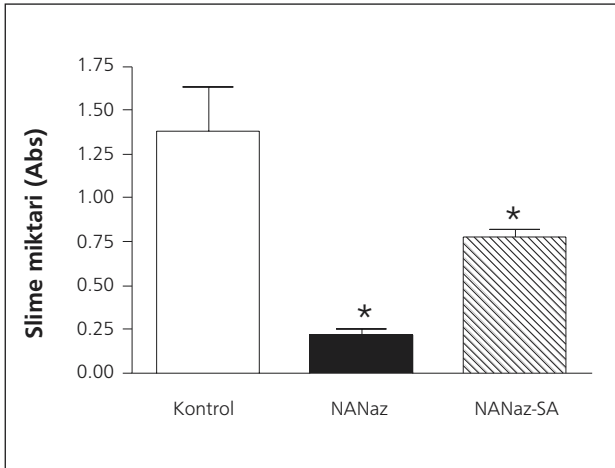
(3) Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, Cebeci-Ankara

(4) Adnan Menderes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Aydın



Şekil 1. NANaz'ın (A) "slime" oluşturan ve (B) "slime" oluşturmeyen KNS'de "slime" oluşumu üzerine etkisi. Siyah sütunlar ortalama \pm (SE) "slime" oluşumuna NANaz muamelesinin etkisini, beyaz sütunlar da kontrol gruplarını göstermektedir.

*NANaz ile muamele edilmemiş KNS (beyaz sütun) ile karşılaştırıldığında anlamlı bir düşüş olduğunu göstermektedir ($p < 0.001$).



Şekil 2. Her bir sütun "slime" oluşturan KNS'nin 300 mU/ml NANaz (siyah sütun), NANaz (300 mU/ml) ile birlikte N-asetilnöraminik asid (SA) (800 µg/ml) (yatık çizgili sütun) ve kontrol grubunun ortalama \pm (SE) absorban değerlerini göstermektedir.

*Kontrol grubuyla (beyaz sütun) karşılaştırıldığında anlamlı bir düşüşün olduğunu ($p < 0.001$); **NANaz ile muamele edilmiş grupla karşılaştırıldığında anlamlı bir artış olduğunu göstermektedir ($p < 0.01$)

%0.25 glikozlu triptik soya buyyonunda (TSB) 37°C'de bir gece üretilen KNS, tekrar %0.25 glikozlu TSB'ye 1/40 oranında ekim yapıldıktan sonra steril 96'lık U tabanlı plakların her bir kuyucuğuna 200 µl eklenerek 37°C'de 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında plaklar boşaltılarak fosfat tamponlu salin ile nazikçe üç kez yıkanıp plaklar ters pozisyonda kurumaya bırakıldı. Kuruyan plaklara 200µl %1'lik kristal viyole eklenerek 15 dakika boyanması için beklendikten sonra tekrar üç kez yıkandı. Kuyucuklar içinde kalan kristal viyole, etanol-aseton (80:20) ile çözülerek kuyucuklar 595 nm'de ELISA mikro plaka

okuyucuda (Bio-tek, Biotech) okunarak absorban değerleri saptandı.

Nöraminidazın "slime" oluşumuna etkisi: "Slime"-pozitif KNS izolatları %0.25 glikozlu TSB ile bir gece 37°C'de inkübe edildi. %0.25 glikozlu TSB besiyerinde 1/40 oranında hazırlanan bakteri solüsyonuna, [1] artan dozlarda (10, 30, 100, 300 mU/ml) *Clostridium perfringens*'ten izole edilmiş nöraminidaz (NANaz; Sigma), [2] NANaz ile birlikte N-asetil nöraminik asid (Sigma) ve [3] sadece besiyerinden oluşan kontrol grupları, steril 96'lık U tabanlı plakların her bir kuyucuğuna 200 µl eklenip kantitatif biyofilm oluşturma deneyi yapıldı. Her bir deney üç kez ve her bir örnek için üç kuyucuk kul-

lanarak yapıldı

İstatistik metod. Deney ve kontrol gruplarının sonuçlarının ortalamaları ANOVA testi kullanılarak karşılaştırıldı ve p değeri < 0.05 olanlar anlamlı kabul edildi.

Sonuçlar

NANaz'ın "slime" oluşumuna etkisi: "Slime" oluşturan KNS, NANaz ile (100 mU/ml ($p < 0.001$) ve üzerindeki konsantrasyonlarda muamelesi sonucu "slime" oluşumunda doza bağımlı bir düşüş olduğu tespit edildi (Şekil 1a). Slime oluşturmeyen KNS grubunda, kontrol ve NANaz ile muamele edilen gruplarda absorban değerlerinde bir farklılık olmadığı tespit edildi (Şekil 1b).

Slime oluşturan KNS'nin "slime" üretimleri üzerine NANaz aktivitesini belirlemek için, 300 mU/ml NANaz aktivitesini bloke eden N-asetilnöraminik asid (800 µg/ml) ile 0.5 saat, 37°C'de inkübe edilerek, yukarıda açıklanan kantitatif biyofilm oluşturma deneyi yapıldı. Çalışma sonunda NANaz aktivitesinin "slime" oluşumu üzerine etkisinin N-asetilnöraminik asid ile muamelesi sonrasında azaldığı görüldü ($p < 0.01$) (Şekil 2).

İrdeleme

Bakteri yüzey yapıları aderans ve virülansta en önemli belirleyicilerdir. Bakteri hücrelerinin biyomateryallere ilişkisinde, çevresel koşullar ve hem materyalin hem de bakterinin yüzey yapısına göre birtakım mekanizmalar rol oynamaktadır. "Slime" bir kısım bakterinin özgün olmayan aderansında önemli yapılardan biridir. Biz bu çalışmada, bakteri yüzeyindeki siyalik asidin uzaklaştırılmasıyla "slime" üreten KNS'nin "slime" üretiminde azalma olduğunu gösterdik.

Bakteri dış polisakarid yapıları "slime" yapısının ana bileşenlerindedir (19). Konunun otörleri tarafından "slime", ilgili bakteri hücrelerinin kendisinin ürettiği polimerik matriks olarak tanımlanmıştır (20-22). Birçok türde "slime" anyonik tabiatla olup çevredeki kullanılmayan esansiyel mineral ve besin maddelerini toplayan bir sistem de oluşturmaktadır (20,22). Temelde "slime", bakterinin yüzey bağlantısını çevre-

leyen, kuvvetlendiren ve koruyan üç boyutlu çekim alanı oluşturur. Bakteri ile inorganik materyaller arasındaki adezyon nonspesifik etkileşim ile olmaktadır canlı yapılarla adezyonu spesifik (adezin, ligand, lektin vs.) etkileşim ile olmaktadır (20). Mikroorganizma inorganik maddelere kritik yakınlığa eriştiğinde (genellikle 1 nm) adezyonun en son belirleyicisi her iki yüzeyin oluşturduğu itici ve çekici güçlerin net toplamı belirlir. Bu güçleri, elektrostatik ve hidrofobik ilişki, van der Waals, ısı ve hidrodinamik güçler oluşturmaktadır (6).

Birçok bakterinin aderansında karbonhidratlar yegane hedef moleküller olup, bunlardan siyalik asid spesifik ve nonspesifik aderansın düzenlenmesinde rol oynayan reseptör, ligand ve adezinlerde yoğun olarak bulunduğu gösterilmiştir (23-28).

Her ne kadar, "slime"nin glikoproteinler, peptidoglikanlar ve polisakaridlerden oluştuğuna ait bilgiler varsa da, kimyasal yapısı halen tam olarak belirlenmemiştir. Hücre yüzeyinde glikokonjugatlar olarak bulunan siyalik asidin, hücre yüzeyine negatif elektrik yük sağlaması ve membrana bağlı bulunan siyalik asid miktarının hücre deformabilite, aderans ve motilitelerini düzenleme gibi özellikleri, siyalik asidin, "slime"nin yapısında yer alabileceğini kuvvetle düşündürmektedir.

Bu çalışmada "slime" oluşturan KNS'de artan dozlardaki NANaz ile muamele sonucu "slime" oluşumunun azalması, NANaz'ın bu aktivitesinin bir farmakolojik blokajı olan N-asetilnöraminik asid ile bloke edilebilmesi, yapısı net olarak belirlenememiş "slime"nin oluşumunda, siyalik asidin önemli rol oynayabileceğini kuvvetle göstermektedir.

Tojo ve arkadaşları (14) *S. epidermidis*'in inorganik yüzeylere adezyonunda rol oynayan galaktozdan zengin kapsül polisakaridini (CPA veya PS/A) izole ettiler. Christensen ve arkadaşları (13) proteaz ve ısıya dayanıklı olan ve CPA'dan farklı olan glikozdan zengin ekstraselüler "slime" ile ilişkili antijeni (SAA) izole ettiler. CPA ve SAA-pozitif ve SAA-negatif *S. epidermidis* suşlarıyla yapılan çalışmalarda, CPA primer adezyonu sağlarken, SAA'nın da yüzeydeki birikmeyi artırıcı (örneğin "slime" oluşmasını) rolünün olduğu tespit edilmiştir (13,14). Bunun yanında, hücre yüzeyinde bulunan siyalik asitlerin büyük bir kısmının oligosakaridlere -glikozidik bağlarla bağlı olduğu gösterilmiştir. Glikoz ve galaktoz siyalik aside en sık bağlanan sakaridler olup bağlanmayı (2 3) ve (2 6) bağlarıyla oluşturmaktadır (29). Çalışmada kullandığımız *C. perfringens*'ten izole edilen NANaz çoktan aza doğru sıralayacak olursak siyalik asidin (2 3), (2 6) ve (2 8) bağlarını kırmaktadır. Biz, bakteri hücre yüzeyinde galaktoz ve glikoz ile bağlanmış siyalik asidin, klostridyal NANaz ile muamele sonucu uzaklaştırılmasının, CPA ve SAA fonksiyonlarını da bozabileceğini ve bu mekanizmayla "slime" oluşumunun ve bakterinin inorganik yüzeylere aderansının azaldığını düşünmekteyiz.

Sonuç olarak, "slime" oluşturan KNS'de "slime" oluşumu ve bakteri aderansı NANaz muamelesi ile azalmaktadır. Bu da siyalik asidin "slime"nin yapısında yer aldığını ve "slime" oluşumu dışında bakterinin aderansında da anahtar molekül olabileceğini göstermektedir.

Bu çalışma Adnan Menderes Üniversitesi MARL-02002 no.'lu araştırma proje desteği ile yapılmıştır.

Kaynaklar

1. Kloos WE, Bannerman TL. Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Rev* 1994; 7: 117-40

- Huebner J, and Goldmann DA. Coagulase-negative staphylococci: role as pathogens. *Annu Rev Med* 1999; 50: 223-36
- Rupp ME, Archer GL. Coagulase-negative staphylococci: pathogens associated with medical progress. *Clin Infect Dis* 1994; 19: 231-43
- Meskin I. Staphylococcus epidermidis. *Pediatr Rev* 1998; 19: 105-6
- Foster TJ, McDevitt D. Molecular basis of adherence of staphylococci to biomaterials. In: Bisno AL, Waldvogel FA, eds. *Infection Associated with Indwelling Medical Devices*. Second ed. Washington, DC: ASM Press, 1994: 31-44
- An YH, Friedman RJ. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces. *J Biomed Mater Res* 1998; 43: 338-48
- Boussaux P, Yasuda H, Velazco MI, Huggler E, Ratti I, Waldvogel FA, Lew DP, Proctor RA. Role of host bacterial factors in modulating staphylococcal adhesion to implanted polymer surfaces. *J Biomater Appl* 1990; 5: 134-53
- Boussard P, Pithys A, Devleeschouwer MJ. Relationship between slime production, antibiotic sensitivity and the phage type of coagulase-negative staphylococci. *J Clin Pharm Ther* 1993; 18: 271-4
- Gray ED, Peters G, Versteegen M, Regelman WE. Effect of extracellular slime substance from Staphylococcus epidermidis on the human cellular immune response. *Lancet* 1984; 1: 365-7
- Ohshima Y, Schumacher-Perdreau F, Peters G, Quie PG, Pulverer G. Antiphagocytic effect of the capsule of Staphylococcus simulans. *Infect Immun* 1990; 58:1350-4
- Souli M, Giamarellou H. Effects of slime produced by clinical isolates of coagulase-negative staphylococci on activities of various antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 939-41
- Karamanos NK, Panagiotopoulou HS, Syrokou A, Frangides C, Hjerpe A, Dimitracopoulos G, Anastassiou ED. Identity of macromolecules present in the extracellular slime layer of Staphylococcus epidermidis. *Biochimie* 1995; 77: 217-24
- Christensen GD, Barker LP, Mawhinney TP, Baddour LM, Simpson WA. Identification of an antigenic marker of slime production for Staphylococcus epidermidis. *Infect Immun* 1990; 58: 2906-11
- Tojo M, Yamashita N, Goldmann DA, Pier GB. Isolation and characterization of a capsular polysaccharide adhesin from Staphylococcus epidermidis. *J Infect Dis* 1988; 157: 713-22
- Cross AS, Wright DG. Mobilization of sialidase from intracellular stores to the surface of human neutrophils and its role in stimulated adhesion responses of these cells. *J Clin Invest* 1991; 88: 2067-76
- Lichtman MA, Weed RI. Alteration of the cell periphery during granulocyte maturation: relationship to cell function. *Blood* 1972; 39: 301-16
- Lichtman MA, Weed RI. Cellular deformability of normal and leukemic hematopoietic cells: a determinant of marrow and vascular egress. In: Weiss L, ed. *Fundamental Aspects of Metastasis*. Amsterdam: North-Holland, 1976: 319-25
- O'Toole GA, Kolter R. Initiation of biofilm formation in Pseudomonas fluorescens WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol Microbiol* 1998; 28: 449-61
- Barding MG, Jass J, Lappin-Scott HM. Dynamics of bacterial biofilm formation. In: Lappin-Scott HM, ed. *Microbial Biofilms*. New York, NY: Cambridge University Press, 1995: 46-63
- Carpentier B, Cerf O. Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. *J Appl Bacteriol* 1993; 75: 499-511
- Elder MJ, Stapleton F, Evans E, Dart JK. Biofilm-related infections in ophthalmology. *Eye* 1995; 9(Pt 1): 102-9
- Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999; 284: 1318-22
- Burnette-Curley D, Wells V, Viscount H, Munro CL, Fennessey P, Macrina FL. FimA, a major virulence factor associated with Streptococcus parasanguis endocarditis. *Infect Immun* 1995; 63: 4669-74
- Demuth DR, Duan Y, Brooks W, Holmes AR, McNab R, Jenkinson HF. Tandem genes encode cell-surface polypeptides SspA and SspB which mediate adhesion of the oral bacterium Streptococcus gordonii to human and bacterial receptors. *Mol Microbiol* 1996; 20: 403-13
- Ilver D, Arnqvist A, Ogren J, Frick IM, Kersulyte D, Incecik ET,

- Berg DE, Covacci A, Engstrand L, Boren T. Helicobacter pylori adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. *Science* 1998; 279: 373-7
26. Hultgren SJ, Abraham S, Caparon M, Falk P, St Geme JW 3rd, Normark S. Pilus and nonpilus bacterial adhesins: assembly and function in cell recognition. *Cell* 1993; 73: 887-901
27. St Geme JW 3rd, Cutter D. Influence of pili, fibrils, and capsule on in vitro adherence by Haemophilus influenzae type b. *Mol Microbiol* 1996; 21: 21-31
28. Sakarya S, Ertem GT, Oncu S, Kocak I, Erol N. Escherichia coli bind to urinary bladder epithelium through nonspecific sialic acid mediated adherence. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2003; 39: 45-50
29. Schauer R. Chemistry, metabolism, and biological functions of sialic acids. *Adv Carbohydr Chem Biochem* 1982; 40: 131-234