

***Staphylococcus epidermidis* un *Pseudomonas aeruginosa*  
adhēzijas un kolonizācijas intensitātes novērošana  
uz biomateriāliem ar dažādas kristalizācijas pakāpi  
un modificētu virsmu *in vitro* pētījumā**

*Aigars Reinis, Agnese Stunda*<sup>1</sup>, *Juta Kroiča,*  
*Valentīna Kuzņecova, Līga Bērziņa-Cimdiņa*<sup>1</sup>, *Jānis Vētra*<sup>2</sup>,  
*Dmitrijs Jakovļevs*<sup>1</sup>, *Dagnija Rostoka*

*Rīgas Stradiņa universitāte,*  
*Mikrobioloģijas katedra, Latvija*

<sup>1</sup> *Rīgas Tehniskās universitāte,*  
*Biomateriālu inovāciju un attīstības centrs, Latvija*

<sup>2</sup> *Rīgas Stradiņa universitāte,*  
*Anatomijas un antropoloģijas institūts, Latvija*

### **Ievads**

Pēdējos gados Latvijā praktiskajā medicīnā bojātu kaulaudu reģenerācijai [1] aizvien plašāk sāk izmantot oriģināli sintezētu biokeramiku, kas satur hidroksilapatītu un bioaktīvos stiklus uz silikātu bāzes. Hidroksilapatīts kā galvenais dabīgā kaula minerāls veido tiešu saiti ar audiem, bez fibrozās kapsulas starpslāņa, kā arī tam ir mazāka spēja piesaistīt mikroorganismus [2]. Tomēr hidroksilapatīta lēnā biodegradācijas un mazās bioaktivitātes dēļ tiek meklēti citi bioloģiski aktīvāki materiāli, modificējot apatīta struktūru vai attīstot bioaktīvo stiklu materiālus [3].

Bioaktīvie stikli uz silikātu bāzes ir plaši pētīti un ir pazīstami ar spēju veidot apatīta slāni uz implanta-audu robežvirsmas, jo tie ir daudz šķīstošāki, kas nodrošina lielāku kaulaudu veidošanas spēju nekā hidroksilapatīts, jo stiklu virsma straujāk mijiedarbojas ar ķermeņa šķīdriem. Tomēr stikla šķīdība ir straujāka par kaulaudu atjaunošanās ātrumu, kā arī ar vāju mehānisko stiprību un cietību. Lai samazinātu stiklu sadalīšanās ātrumu un uzlabotu mehāniskās īpašības, stiklu kristalizē, iegūstot stikla keramiku. Tomēr silikātu ietekme uz organismu ilgākā laika posmā vēl nav izpētīta, bet fosfātu stikli ir tuvāki cieto audu sastāvam, samērā viegli izgatavojami un to biosaderība un bioaktivitāte ir pierādīta [4; 5].

Kopējām kalcija fosfātu materiālu iezīmēm ir raksturīga liela īpašību atkarība no lietotajām piedevām, lai gan, analizējot jonu nozīmi un lomu materiālā, noteikti ir jāņem vērā, ka jāskatās viss stikla sastāvs kopumā, jo, atkarībā no koncentrācijas un pārējā ķīmiskā sastāva, konkrētā jona nozīme var ļoti mainīties [3]. Bioaktivitāte ir atkarīga arī no materiāla mikrostruktūras un makrostruktūras, no izveidotajiem savienojumiem un to kristāliskuma [5].

Biomateriālu izmeklēšanu nosaka virkne ISO standartu [8], bet tajos nav akcentētas mikrobioloģiskās testēšanas metodes un virzieni, lai gan daudziem mikroorganismiem, bieži normālās floras pārstāvjiem, piemīt afinitāte pret organismā implantētiem mākslīgiem objektiem. Kā piemērus var minēt stafilokokus, it īpaši – *Staphylococcus epidermidis* [9, 10], *Pseudomonas aeruginosa* [10] u. c. baktērijas.

Biomateriālu bakteriālai kontaminācijai ir iespējami dažādi iemesli un divgalvenie ceļi. Tieša implantāta kontaminācija [10; 11] ir visbiežākais ceļš. Baktērijas nokļūst uz biomateriāla virsmas ķirurģiskās operācijas laikā un to kolonizē. Kā bakteriālā piesārņojuma avots varētu būt pacienta ādas vai gļotādu mikroflora, gaisa, medicīnas personāla mikroflora utt. Vēl ir iespējama implantāta kontaminācija baktēriju hematogēnas vai limfogēnas diseminācijas ceļā [10; 11]. Bakteriālās kontaminācijas avots – ādas un gļotādas mikroflora.

Līdz ar to, par spīti aseptikas un antiseptikas metožu izmantošanai, mikroorganismu spēja inficēt un kolonizēt implantēto biomateriālu vai kādu ierīci joprojām ir aktuāla un ir riska faktors hospitālo infekciju attīstībā [12].

Tāpēc kļūst aktuāli pētījumi, lai noteiktu vienu no būtiskākajām biomateriālu īpašībām – to mikrobiālo kontaminācijas risku.

## Darba mērķis, materiāls un metodes

Pētījuma mērķis ir noteikt *Staphylococcus epidermidis* un *Pseudomonas aeruginosa* adhēzijas un kolonizācijas intensitāti uz oriģināli sintezētu stikla keramikas biomateriālu virsmas.

## Stikla keramikas iegūšana un raksturojums

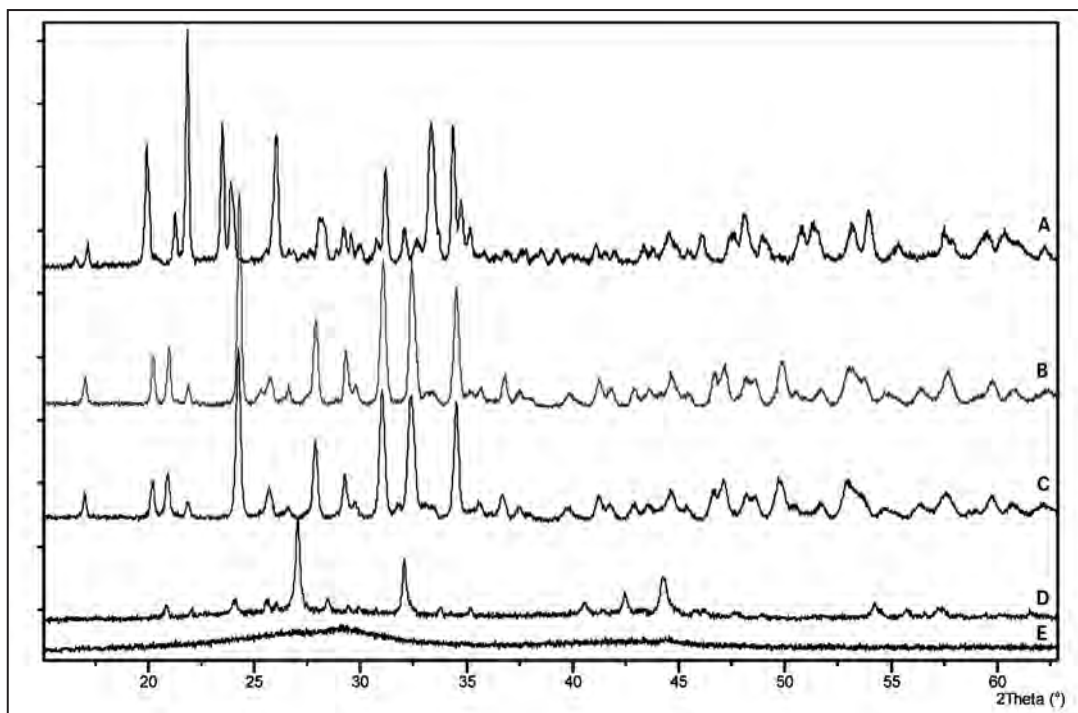
Šajā pētījumā kalcija fosfāta bāzei tika pievienots niobija oksīds mehāniskās izturības paaugstināšanai un nātrija oksīds – šķīdības un bioaktivitātes uzlabošanai. Līdzīga sastāva keramikas biosaderība ir konstatēta jau iepriekšējos pētījumos [4; 5; 6]. Stikla keramika tika izgatavota klasiskā divpakāpju procesā: vispirms iegūstot stikla pulveri, tad to presējot formā un, veicot termisko apstrādi, tas tika salipināts un kristalizēts. Kristalizācijas temperatūras tika noteiktas ar diferenciāļtermisko analizatoru BAHR-DTA 703.

Lai arī niobija oksīds ir plaši zināms stiklu kristalizācijas veicinātājs, tomēr šajā pētījumā izmantotais stikls sāka kristalizēties no virsmas vai no mikroplaisām. Tādēļ – kā arī lai iegūtu daudzveidīgāku stikla keramikas mikrostruktūru – par izejvielu tika izmantots polidisperss stikla pulveris. Kristālisko fāžu un mikrostruktūras analīzei tika izmantots skenējošais elektronu mikroskops *Tescan (Mira/LMU, High Resolution Schottky FE SEM)* un rentģendifraktometrs *PANalytical X'Pert Pro* ar 2005. gada ICDD datubāzi.

Visi stikla pulveri bija iegūti no analoga sastāva šihām, tikai minimāli atšķīrās to iegūšanas apstākļi. Tā kā niobijs kā pārejas elements ir samērā nestabils un fosfātu stikli ir gaistoši, tad dažādas nianšes kausējuma laikā var iespaidot iegūto stikla pulveri. No vairāku stikla pulveru sērijām izvēlējās 3 pulverus, kas veidoja pēc sastāva un mikrostruktūras dažādas kristāliskās fāzes. Paraugus apzīmēja ar burtiem no A līdz E. Paraug A bija no 1. izejvielas, kas jau pirms saķepināšanas bija kristalizēta. Paraug B un C bija no 2. izejvielas, kas sākotnēji bija amorfa, bet salipināšanas laikā tika kristalizēta. Ar DTA noteikts, ka kristalizēšanās temperatūra bija 712–720 °C, tāpēc B tika iegūts 760 °C, lai produkts būtu izteikti kristālisks, bet C tika iegūts 700 °C temperatūrā, lai būtu vairāk amorfās fāzes, taču, tā kā sastāvs bija ar lielu kristalizācijas tieksmi, tad iegūtais produkts pēc XRD spektriem bija ļoti līdzīgs B parauga spektram (sk. 1. att.). Paraugi D un E tika iegūti no 3. izejvielas, līdzīgi kā paraugi B un C, arī šie paraugi atšķīrās ar kristāliskuma pakāpēm. Paraug D bija iegūts, saķepinot augstākā temperatūrā (760 °C), kas veicina kristalizāciju, bet paraug E bija salipināts 700 °C temperatūrā un bija izteikti amorf.

Daži no iegūtajiem stikla keramikas variantiem tika arī kodināti (paraugi B+, D+ un E+), lai samazinātu amorfās fāzes daudzumu uz virsmas un palielinātu virsmas raupjumu. Kodināšana tika veikta 30 sek. ar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, HF un HNO<sub>3</sub> maisījumu.

1. attēls. Paraugu A, B, C, D, E XRD spektri.  
XDR analysis of biomaterial samples.



### Mikrobioloģiskie testi

Mikrobioloģiskajai analīzei izmantojām 8 oriģināli sintezētus biomateriālus ar dažādu kristalizācijas pakāpi un virsmas modifikāciju, kas tika iegūti pēc iepriekš aprakstītās metodes.

A – izejviela un produkts bija kristāliski, maksimālā apdedzināšanas temperatūra bija 1005 °C 30 min.

B – izejviela bija amorfa, produkts – kristālisks, 760 °C 60 min.

B+ – B kodināts (30 h, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, HF, HNO<sub>3</sub>), vieglāk šķīstošās amorfās fāzes uz virsmas bija mazāk.

C – apstrādāts 700 °C 30 min, izejviela bija amorfa, produkts – kristālisks.

D – apstrādāts 760 °C 60 min, izejviela bija amorfa, produkts – daļēji kristālisks.

D+ – apstrādāts 760 °C 60 min, kodināts (30 h, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, HF, HNO<sub>3</sub>), uz virsmas mazāk vieglāk šķīstošās amorfās fāzes.

E – apstrādāts 700 °C 30 min, amorfa izejviela, amorfs produkts.

E+ – E kodināts (30 h, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, HF, HNO<sub>3</sub>), vieglāk šķīstošās amorfās fāzes uz virsmas bija mazāk.

Pētījumā tika izmantotas *Ps. aeruginosa* ATCC 27853, *S. epidermidis* ATCC 12228 references kultūras. No baktēriju tīrkultūrām gatavoja baktēriju suspensijas 1 ml TSB tilpumā ar koncentrāciju 10<sup>3</sup> CFU/ml (*colony forming units*). Paraugus kultivēja 37 °C temperatūrā 2 h adhēzijas intensitātes noteikšanai un 48/72 h kolonizācijas intensitātes noteikšanai. Adhēzijas un kolonizācijas izvērtēšanai izmantoja skenējošo elektronmikroskopu (SEM) un uzsējumu metodi koloniju skaita noteikšanai. Pēc inkubēšanas noskaloja nepiesaistītos mikroorganismus. Lai atdalītu pie biomateriālu virsmas piesaistījušās baktērijas, diskus 1 min apstrādāja ultraskaņas vannā (45 kHz frekvencē) un 1 min maksimālos apgriezīenos *Vortex* centrifūgā. No katra parauga gatavoja 2 uzsējumus uz TSA barotnes (*Oxoid*, Anglija), kultivēja 24 stundas 37 °C temperatūrā, lai noteiktu kopējo mikroorganismu daudzumu, un aprēķināja CFU daudzumu 1 mm<sup>2</sup> biomateriāla diska laukuma. Paraugi SEM tika sagatavoti, fiksējot ētera-etilspirta 1:1 maisījumā. Iegūtos datus analizēja, izmantojot datorprogrammas *SPSS 11.0 for Windows* un *Microsoft Office Excel*.

**Rezultāti**

XRD analizē konstatēja, ka paraugs, kas apzīmēts ar burtu A, saturēja  $\text{Na}_4\text{Nb}_8\text{P}_4\text{O}_{32}$ ,  $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ ,  $\text{NaNbO}_3$ , paraugi B un C saturēja  $\text{Na}_4\text{Nb}_8\text{P}_4\text{O}_{32}$ ,  $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ ,  $\text{NaNbO}_3$ ,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , bet D un E paraugiem, lai arī XRD spektrā maksimumi bija pietiekami labi izteikti, tomēr kristāliskās fāzes nebija izdevies identificēt (sk. 1. att.).

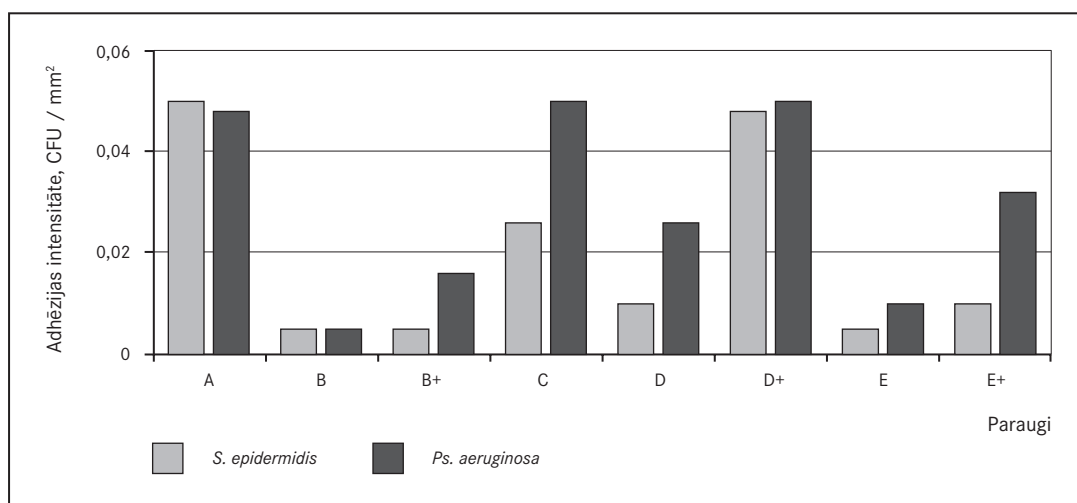
Izmantojot uzsējumu metodi, atklāja, ka abiem pētījumā izmantotajiem mikroorganismiem adhēzija intensīvāk notika uz A biomateriāla virsmas, kas bija izteikti kristāliska. Uz C biomateriāla virsmas *S. epidermidis* adhēzijas intensitāte bija uz pusi mazāka ( $0,026 \text{ CFU/mm}^2$ ) nekā *Ps. aeruginosa* ( $0,05 \text{ CFU/mm}^2$ ). Tāpat augsta spēja piesaistīties abiem mikroorganismiem bija novērojama uz D+ biomateriāla – *S. epidermidis*  $0,048 \text{ CFU/mm}^2$  un *Ps. aeruginosa*  $0,05 \text{ CFU/mm}^2$ . Zema spēja piesaistīt abas pētāmās baktērijas bija biomateriāliem B (abiem mikroorganismiem  $0,005 \text{ CFU/mm}^2$ ), B+ (*S. epidermidis*  $0,005 \text{ CFU/mm}^2$  un *Ps. aeruginosa*  $0,016 \text{ CFU/mm}^2$ ), D (*S. epidermidis*  $0,01 \text{ CFU/mm}^2$  un *Ps. aeruginosa*  $0,026 \text{ CFU/mm}^2$ ), E (*S. epidermidis*  $0,005 \text{ CFU/mm}^2$  un *Ps. aeruginosa*  $0,01 \text{ CFU/mm}^2$ ) un E+ (*S. epidermidis*  $0,01 \text{ CFU/mm}^2$  un *Ps. aeruginosa*  $0,032 \text{ CFU/mm}^2$ ), sk. 1. tab. un 2. att.

*S. epidermidis* un *Ps. aeruginosa* kolonizācijas intensitāte uz pētāmo biomateriālu virsmas tika pētīta, izmantojot uzsējumu metodi un skenējošo elektronmikroskopu, pēc 48 un 72 stundu kultivēšanas. Intensīvi abu baktēriju kolonizācija notika uz A un C biomateriālu virsmas. Vidēji intensīvi tika kolonizēta virsma biomateriāliem B, B+ un E+ biomateriāliem. Zema kolonizācijas intensitāte tika novērota uz biomateriāliem D, D+ un E (sk. 2. un 3. tab., 3. un 4. att.).

1. tabula. *S. epidermidis* un *Ps. aeruginosa* adhēzijas intensitāte pēc 2 h kultivēšanas  $\text{CFU / mm}^2$  ( $p < 0,05$ ).  
Bacterial adhesion intensity after 2 hours ( $\text{CFU / mm}^2$ ) ( $p < 0,05$ ).

	A	B	B+	C	D	D+	E	E+
<i>S. epidermidis</i>	0,05	0,005	0,005	0,026	0,01	0,048	0,005	0,01
<i>Ps. aeruginosa</i>	0,048	0,005	0,016	0,05	0,026	0,05	0,01	0,032

2. attēls. *S. epidermidis* un *Ps. aeruginosa* adhēzijas intensitāte ( $\text{CFU / mm}^2$ ) pēc 2 h kultivēšanas.  
*S. epidermidis* and *Ps. aeruginosa* adhesion intensity after 2 hours ( $\text{CFU / mm}^2$ ).



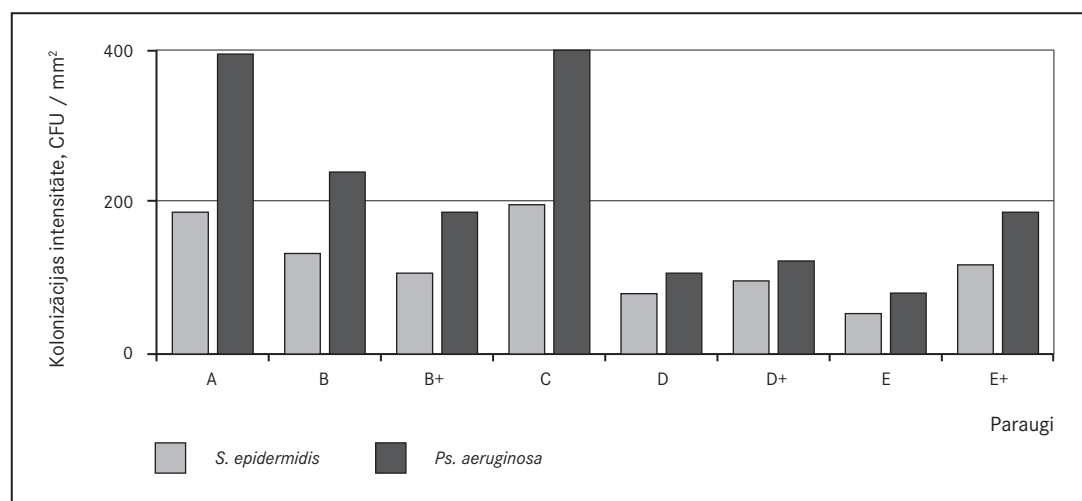
2. tabula. *S. epidermidis* un *Ps. aeruginosa* kolonizācijas intensitāte pēc 48 h kultivēšanas CFU / mm<sup>2</sup> (p < 0,05).  
*S. epidermidis* and *Ps. aeruginosa* colonisation intensity after 48 hours (CFU / mm<sup>2</sup>) (p < 0.05).

	A	B	B+	C	D	D+	E	E+
<i>S. epidermidis</i>	186	132	106	196	79	96	53	117
<i>Ps. aeruginosa</i>	394	239	186	399	106	122	80	186

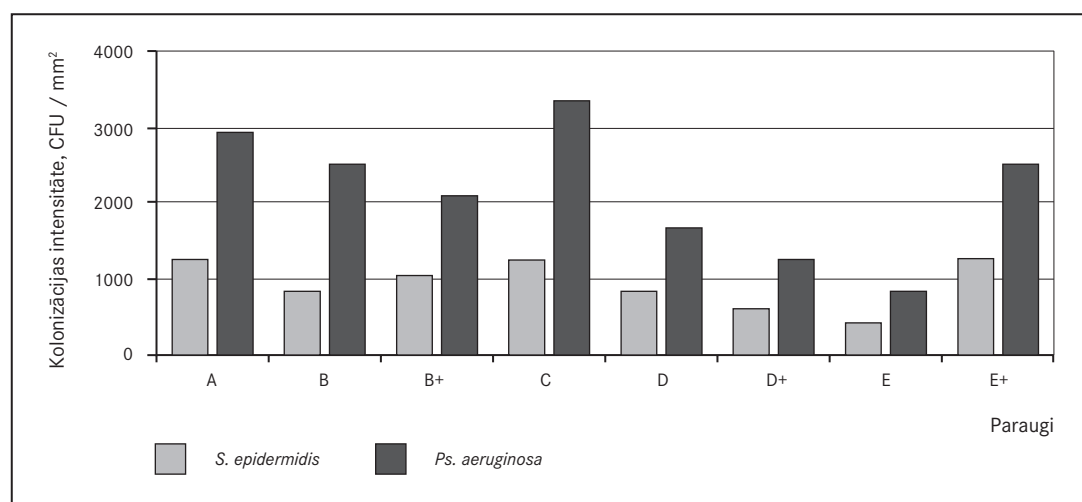
3. tabula. *S. epidermidis* un *Ps. aeruginosa* kolonizācijas intensitāte pēc 72 h kultivēšanas CFU / mm<sup>2</sup> (p < 0,05).  
*S. epidermidis* and *Ps. aeruginosa* colonisation intensity after 72 hours (CFU / mm<sup>2</sup>) (p < 0.05).

	A	B	B+	C	D	D+	E	E+
<i>S. epidermidis</i>	1255	835	1042	1245	835	607	420	1265
<i>Ps. aeruginosa</i>	2926	2505	2090	3340	1670	1255	835	2505

3. attēls. *S. epidermidis* un *Ps. aeruginosa* kolonizācijas intensitāte (CFU / mm<sup>2</sup>) pēc 48 h kultivēšanas.  
*S. epidermidis* and *Ps. aeruginosa* colonisation intensity after 48 hours (CFU / mm<sup>2</sup>).

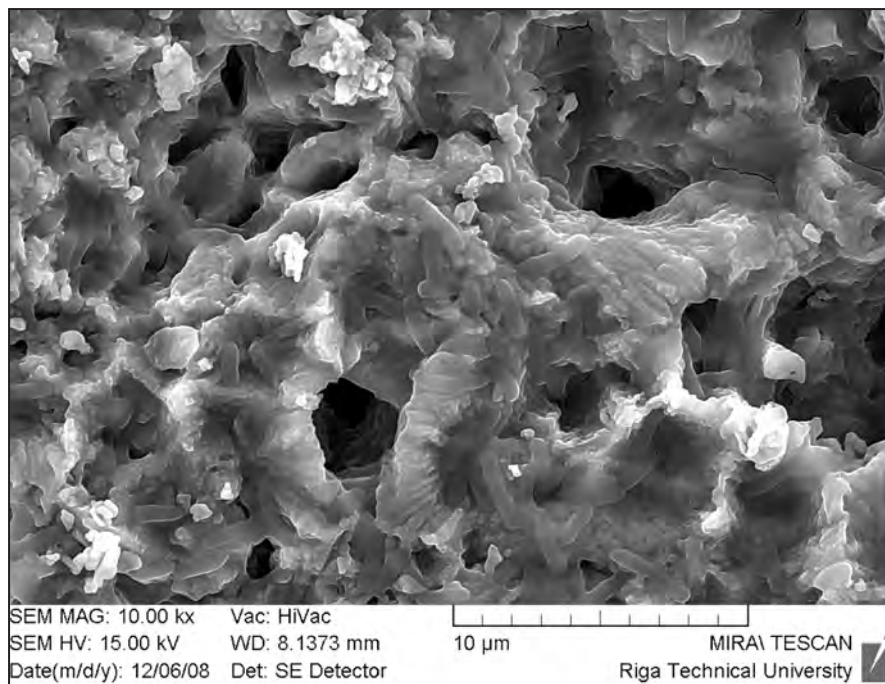


4. attēls. *S. epidermidis* un *Ps. aeruginosa* kolonizācijas intensitāte (CFU / mm<sup>2</sup>) pēc 72 h kultivēšanas.  
*S. epidermidis* and *Ps. aeruginosa* colonisation intensity after 72 hours (CFU / mm<sup>2</sup>).



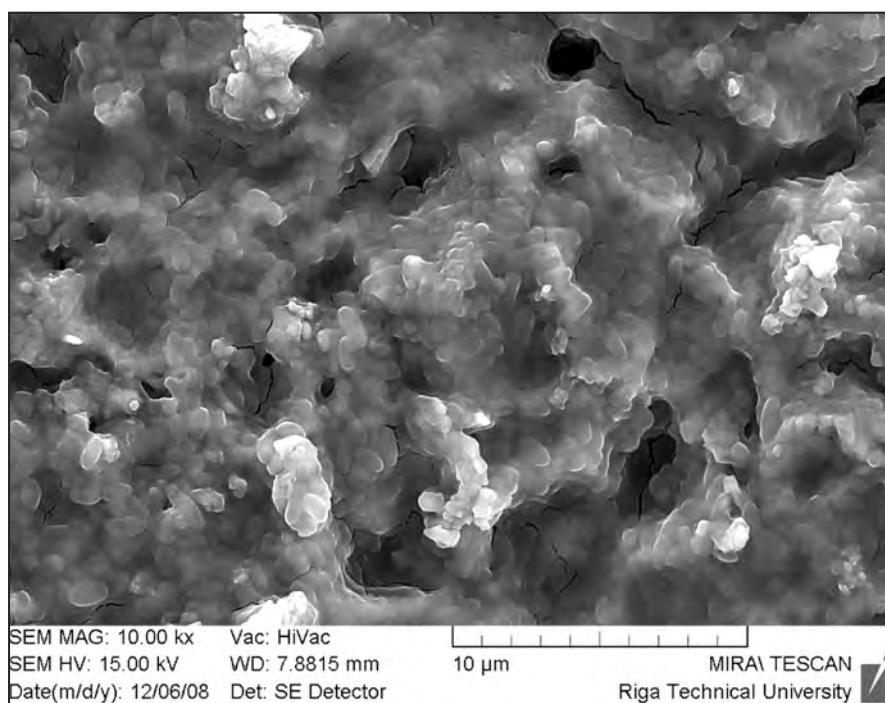
5. attēls. *Ps. aeruginosa* kolonizācijas intensitāte uz B biomateriāla virsmas pēc 48 stundām. Novērojām ar glikokaliksu pārklātu biofilmu, ko caurvij kanāli.

*Pseudomonas aeruginosa* colonisation level on biomaterial B after 48 hour colonisation. We observed that the surface is covered in biofilm and glycocalyx over it, all permeated by canals.

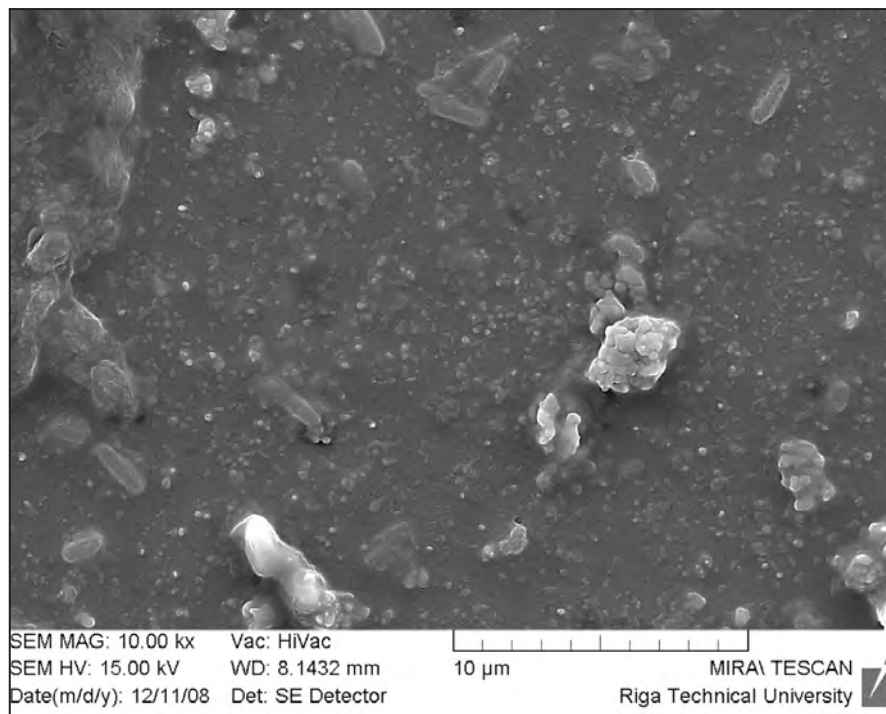


6. attēls. *Ps. aeruginosa* kolonizācijas intensitāte uz B biomateriāla virsmas pēc 72 stundām. Novērojām, ka virsma bija pilnībā pārklāta ar biofilmu, nosegta ar glikokaliksu.

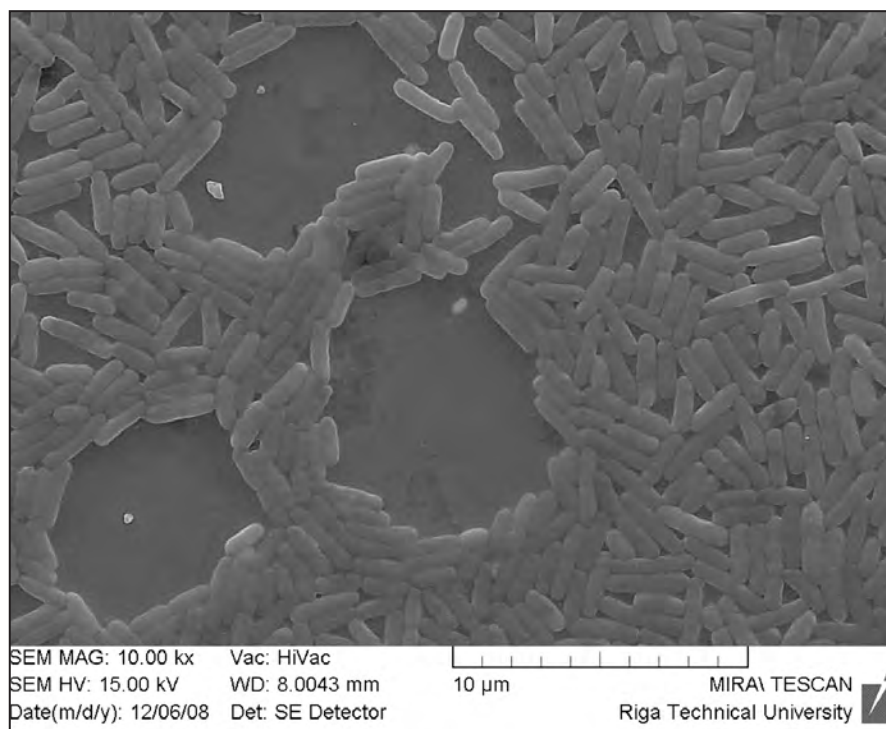
*Pseudomonas aeruginosa* colonisation level on biomaterial B after 72 hour colonisation. We observed that the surface is entirely covered by a biofilm and glycocalyx.



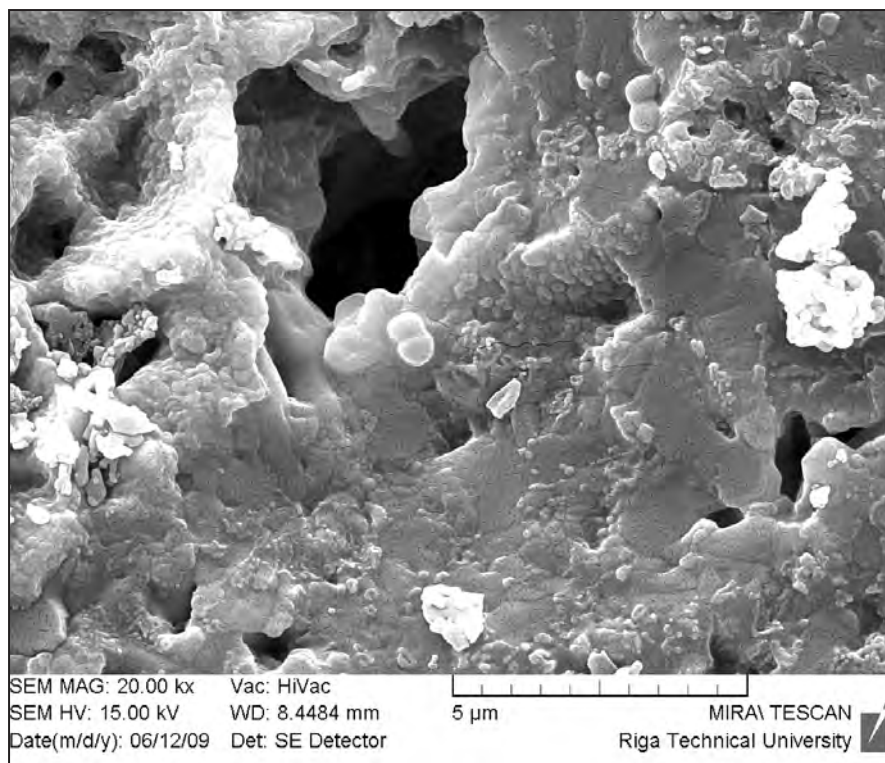
7. attēls. *Ps. aeruginosa* kolonizācijas intensitāte uz D biomateriāla ar amorfāku virsmu pēc 48 stundām.  
*Pseudomonas aeruginosa* colonisation level on biomaterial D with more amorphous surface after 48 hour colonisation.



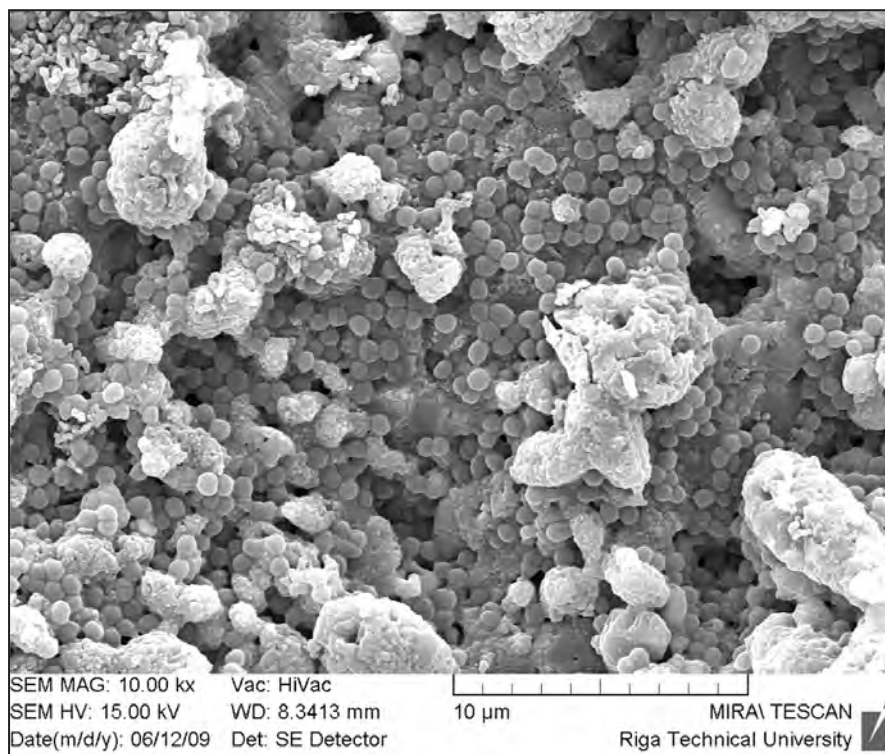
8. attēls. *Ps. aeruginosa* kolonizācijas intensitāte uz D biomateriāla ar amorfāku virsmu pēc 72 stundām.  
 Novērojām gandrīz pilnīgu virsmas kolonizāciju.  
*Pseudomonas aeruginosa* colonisation level on biomaterial D with more amorphous surface after 72 hour colonisation. We observed that the surface is almost entirely colonised.



9. attēls. *S. epidermidis* kolonizācijas intensitāte uz B biomateriāla virsmas pēc 48 stundām.  
*Staphylococcus epidermidis* colonisation level on biomaterial B after 48 hour colonisation.

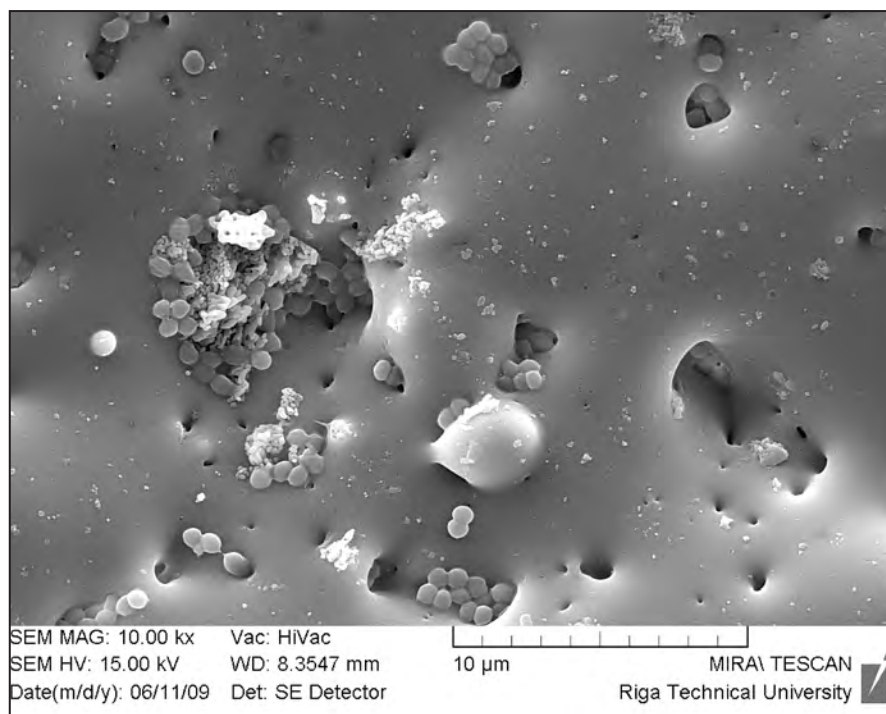


10. attēls. *S. epidermidis* kolonizācijas intensitāte uz B biomateriāla virsmas pēc 72 stundām.  
*Staphylococcus epidermidis* colonisation level on biomaterial B after 72 hour colonisation.

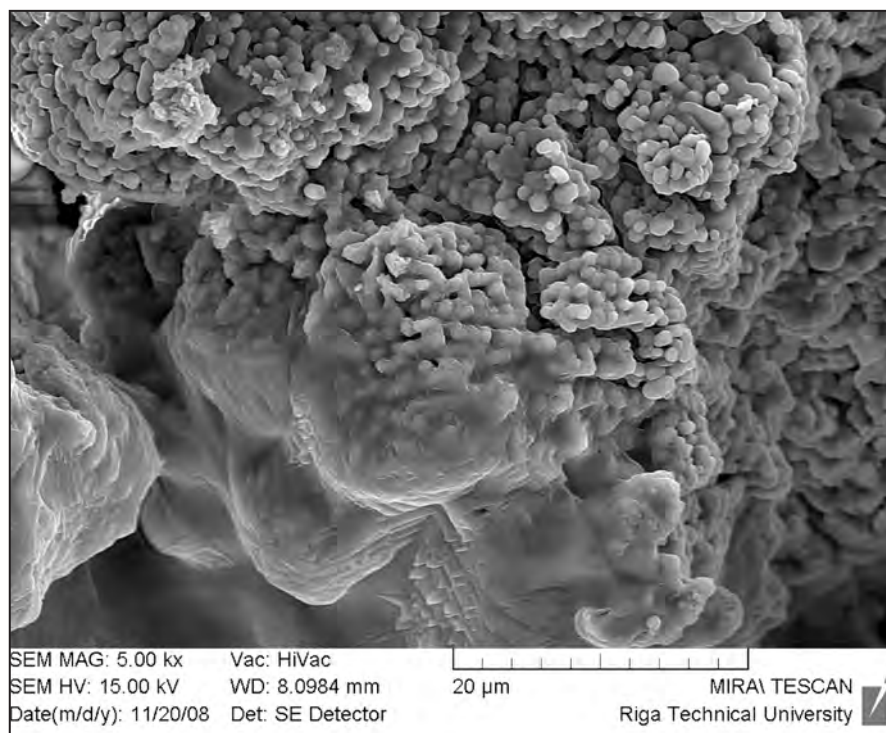




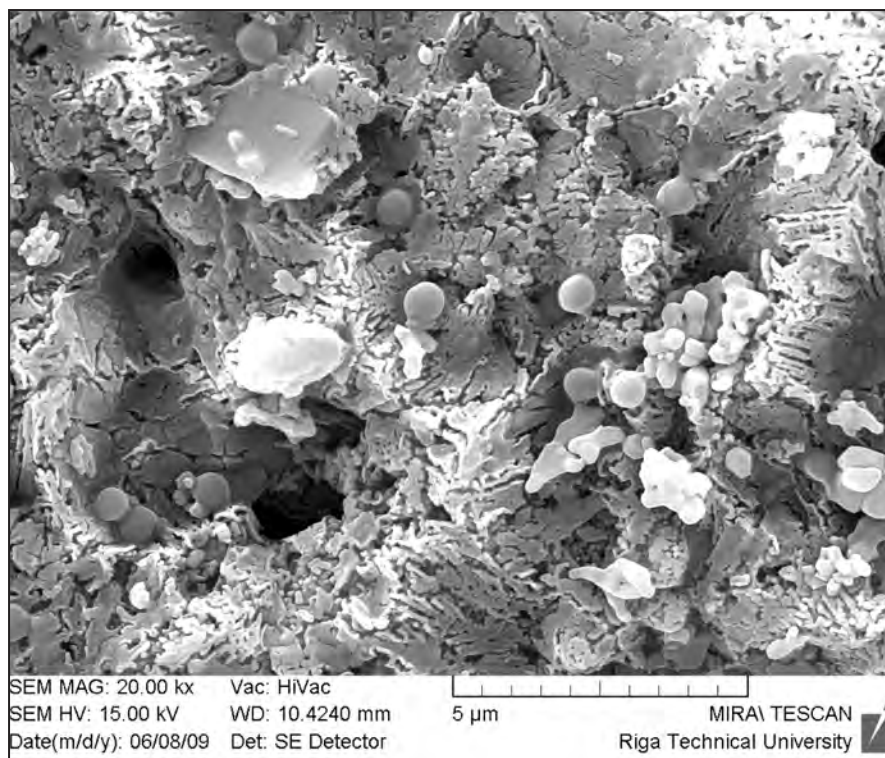
11. attēls. *S. epidermidis* kolonizācijas intensitāte uz D biomateriāla ar amorfāku virsmu pēc 48 stundām.  
*Staphylococcus epidermidis* colonisation level on biomaterial D with more amorphous surface after 48 hour colonisation.



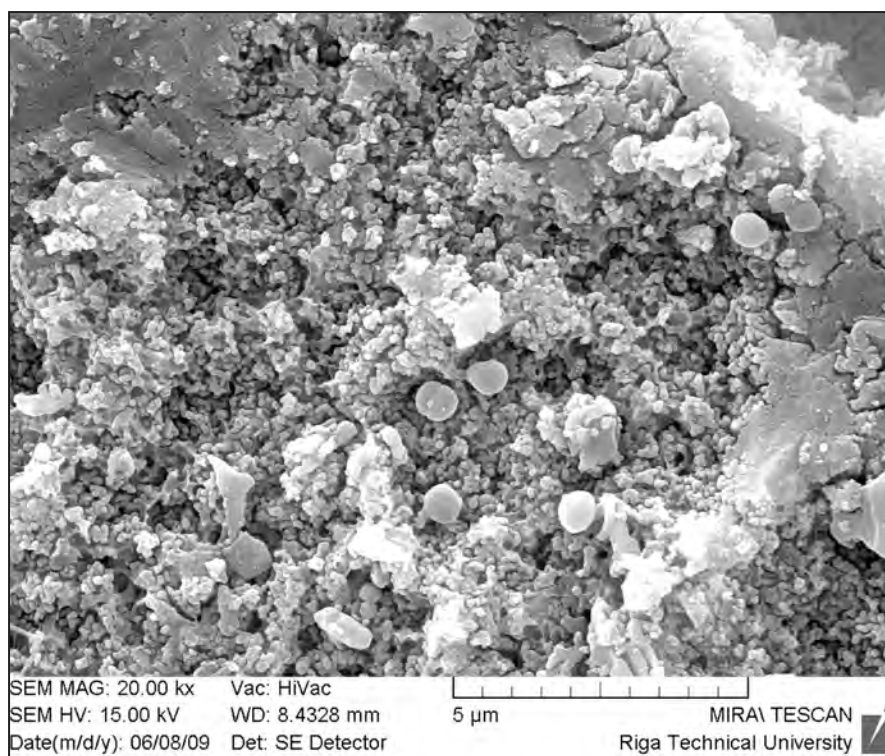
12. attēls. *S. epidermidis* kolonizācijas intensitāte uz D biomateriāla ar amorfāku virsmu pēc 72 stundām.  
 Redzama *S. epidermidis* kolonija, ko pārklāj glikokaliksa slānis.  
*Staphylococcus epidermidis* colonisation level on biomaterial D with more amorphous surface after 72 hour colonisation. We observed that *S. epidermidis* colony is covered by glycocalyx.



13. attēls. Kodināts B+ biomateriāls ar *S. epidermidis* kolonizāciju pēc 48 stundām.  
*Staphylococcus epidermidis* colonisation level on etched biomaterial B+ after 48 hour colonisation.



14. attēls. Kodināts D+ biomateriāls ar *S. epidermidis* kolonizāciju pēc 48 stundām.  
*Staphylococcus epidermidis* colonisation level on etched biomaterial D+ after 48 hour colonisation.



## Diskusija

Pamatojoties uz SEM iegūtajiem novērojumiem un mikrobioloģisko uzsējumu rezultātiem, jādomā, ka ļoti liela nozīme mikroorganismu adhēzijā un kolonizācijā uz biomateriāliem ir virsmas īpašībām – kristāliskajai vai amorfajai fāzei.

Mēs novērojam, ka uz amorfās virsmas biomateriāliem *Ps. aeruginosa* neveido tik blīvu biofilmu kā uz kristāliskajiem un, lai arī tiek kolonizēta visa virsma, biofilma ir plānāka un nav tik izteikti klāta ar glikokaliksu kā kristāliskā B biomateriāla gadījumā. Tas liek domāt, ka biomateriāli ar amorfāku virsmu nav tik labvēlīgi baktēriju kolonizācijai kā biomateriāli ar kristālisko virsmu. Piemēram, *S. epidermidis* kolonizācija uz kristāliskā biomateriāla B 48 un 72 stundu laikā ir attēlota 9. un 10. attēlā, kur ir labāk redzama biomateriāla virsma, jo stafilokoks to pārklāj retāk nekā *Ps. aeruginosa*, veidodams izklaidus novietotas kolonijas. Šo atšķirīgo *Ps. aeruginosa* un *S. epidermidis* kolonizāciju uz pētāmajiem biomateriāliem ļoti labi var novērot 5. un 6. attēlā, kur kā piemērs parādīts kristāliskais biomateriāls B, un labi var redzēt *Ps. aeruginosa* biofilmas veidošanās dinamiku uz biomateriāla B virsmas, kad pēc 48 stundām varējām novērot ar glikokaliksu pārklātu biofilmu, ko caurvija kanāli un caur kuru vēl bija redzama biomateriāla kristāliskā virsma, bet pēc 72 stundām biomateriāla virsmu jau sedza pilnīgi kompakta, ar glikokaliksu noklāta biofilma.

Pretēji kristāliskajiem biomateriāliem, raksturīga amorfa virsma ir redzama 11. attēlā, kur parādīts D biomateriāls, uz kura stafilokoks izteiktākas kolonijas veido tikai vēlākās kolonizācijas stadijas – pēc 72 stundām, kā to var redzēt 12. attēlā. Savukārt 7. un 8. attēlā ir parādīta *Ps. aeruginosa* kolonizācija uz šī paša biomateriāla D. Runājot par kodinātajiem biomateriāliem, jāakcentē, ka kodināšanu veica, lai uz virsmas samazinātu vieglāk šķīstošo amorfo fāzi. B+ kodinātā biomateriāla virsmas atšķirības labi redzamas 13. attēlā, salīdzinot ar 9. attēlā redzamo nekodināto B biomateriālu. Tāpat arī var redzēt 11. attēlā amorfā biomateriāla D virsmas pārmaiņas, salīdzinot ar 14. attēlu, kur redzama D+ kodinātā biomateriāla virsma.

Tātad ir jādomā, ka biomateriāliem ar izteiktu amorfo fāzi piemīt lielāka spēja piesaistīt pie savas virsmas mikroorganismus, savukārt, kodināšanas procesā samazinot amorfo fāzi uz biomateriāla virsmas, varētu panākt tikai to, ka biomateriāls kļūst mikrobioloģiski “nedrošāks”.

Tāpat arī, analizējot attēlus, kas iegūti, izmantojot skenējošo elektronmikroskopu, ļoti labi varēja novērot atšķirīgo *Ps. aeruginosa* un *S. epidermidis* kolonizācijas veidu uz pētāmajiem biomateriāliem. Tika novērots, ka *Ps. aeruginosa* bija tendence kolonizēt visu biomateriāla virsmu, veidojot vairāk vai mazāk biezu biofilmu ar to caurvijošiem kanāliem. Pēc 72 stundu kolonizācijas varēja novērot glikokaliksu, kas pilnīgi pārklāja koloniju, nosedzot arī kanālus. *Ps. aeruginosa* bija arī labāka kolonizācijas tendence uz kristāliskiem un kodinātiem biomateriāliem, ja salīdzina ar biomateriāliem ar amorfāku virsmu. Turpretim *S. epidermidis* kolonizēja, veidojot retas un kompakas kolonijas, un arī bija vērojama tendence labāk kolonizēt kristāliskos un kodinātos biomateriālus.

Tomēr, lai līdz galam izvērtētu sintezēto biomateriālu mikrobioloģisko “drošumu”, jāveic *in vivo* testi, lai noteiktu minimālo biomateriālu inficējošo devu, kā arī izvērtētu biomateriālu reaktogenitāti ar saistaudiem.

## Secinājumi

1. Izmantojot SEM, tika konstatēts, ka *Ps. aeruginosa* veidoja blīvāku slāni ar polipveidīgiem izaugumiem un kanāliem starp tiem. Biofilmas slānis pārklāja praktiski visu biomateriālu. *S. epidermidis* veidoja retāk izkaisītas, kompakākas kolonijas.
2. Izmantojot uzsējumu metodi, tika pierādīts, ka *Ps. aeruginosa* ir tendence labāk piesaistīties un kolonizēt pētījumā izmantotos biomateriālus nekā *S. epidermidis*, kā arī šajā procesā bija iesaistīta praktiski visa biomateriāla virsma. *S. epidermidis* savukārt veidoja atsevišķas, pa biomateriāla virsmu izkaisītas kolonijas.
3. Kolonizācijas intensitāte 48 un 72 stundu laikā uz dažādu biomateriālu virsmas ir atšķirīga.
4. Biomateriālu pagatavošanas tehnoloģiskajā procesā iegūtais kristāliskums un virsmas raupjums bija nozīmīgi faktori, kas ietekmēja adhēziju un kolonizāciju.
5. Adhēzija un kolonizācija bija izteiktāka uz kristālisko biomateriālu un kodināto biomateriālu virsmas nekā uz amorfo biomateriālu virsmas, līdz ar to biomateriāli ar izteiktāku amorfo fāzi būtu uzskatāmi par mikrobioloģiski drošākiem.
6. Lai izlemtu par biomateriālu ar lielāku amorfo fāzi nodošanu ražošanā, jāveic *in vivo* tests – biomateriāla “minimālās inficējošās devas” un reaktogenitātes ar makroorganismu noteikšanai.



***Staphylococcus epidermidis* and *Pseudomonas aeruginosa* Adhesion and Colonisation Intensity on Biomaterials with Various Crystallisation Degrees and Modified Surfaces in an *in vitro* Study**

**Abstract**

In the last few years the use of originally synthesised biomaterials in practical medicine has been extensively utilised in Latvia, therefore it is important to carry out studies in order to determine one of the most relevant biomaterial characteristics – their microbial contamination risk. The objective of this study is to explore the adhesion and colonisation degree of two bacteria species on eight originally synthesised biomaterial surfaces.

Eight sorts of glass-ceramic biomaterials were tested in the study. Glass-ceramics were obtained from glass powder by repeatedly heating it. The starting materials were three analogous composition batches which were melted in different obstacles. That gave the glass powder various tendencies to crystallize. The crystalline phases and crystallinity rate of glass-ceramics was determined by XRD.

Bacterial species used in the study are *Ps. aeruginosa* ATCC 27853 and *S. epidermidis* ATCC 12228. Biomaterial discs were contaminated with  $10^3$  CFU/ml (colony forming units) of respective bacterial suspensions and after two hours of cultivation the adhesion intensity was determined. Colonisation intensity was determined after 48 and 72 hours. Adhesion and colonisation degree was evaluated with a scanning electron microscope (SEM), as well as a plate count method. CFU quantity was calculated as  $1 \text{ mm}^2$  of biomaterial disc surface. Adhesion intensity on both biomaterial surfaces was compared by using softwares *SPSS 11.0 for Windows* and *Microsoft Office Excel*.

Using SEM it was determined that *Ps. aeruginosa* forms a denser layer with polypoid outgrowths and canals between them, the biofilm layer covers the entire biomaterial. *S. epidermidis* forms less frequently scattered, more compact (denser) colonies. Using the plate count method it was determined that *Ps. aeruginosa* has a more distinct adhesion and colonisation degree on the entire biomaterial surface. After 72 h the colonisation degree of *Ps. aeruginosa* is at least twice as much as of *S. epidermidis*. Colonisation intensity within a 48 and 72 hour period on different biomaterial surfaces varies.

**Literatūra**

1. Salms G., Berzina L., Cimdinš R., et al. Outcome of Semados dental implants in one stage with sinus floor elevation by Hap granules // *Stomatologija*, 2002; 4 (1): 2-7.
2. Reinis A., Kroiča J., Vētra J. u. c. Biomateriālu spēja piesaistīt *Staphylococcus epidermidis* pētījumā *in vitro* // *RSU zinātniskie raksti*, 2002; 211.-214. lpp.
3. Hench Larry L. Ceramics, glasses and glass-ceramics // *Biomaterials science*. - Elsevier Academic Press, 1997. - Pp. 73-83.
4. Markani A., Maheswaran A., Premanathan M., et al. Synthesis and characterization of calcium phosphate based bioactive quaternary  $\text{P}_2\text{O}_5\text{-CaO-Na}_2\text{O-K}_2\text{O}$  glasses // *Journal of Non-Crystalline Solids*, 2008; 354: 3929-3934.
5. ElBatal H. A., Khalil E. M. A., Hamdy Y. M. In vitro behavior of bioactive phosphate glass-ceramics from the system  $\text{P2O5-Na}_2\text{O-CaO}$  containing titania // *Ceram. Int.*, Apr. 2009; 35(3): 1195-1204.
6. Bērziņa L. Стеклокерамические материалы на основе фосфорсодержащих систем. - Rīga, 1989.
7. Berzina L., Cimdinš R., Vētra J., et al. Bioceramics in the System  $\text{CaO-Nb}_2\text{O}_5\text{-P}_2\text{O}_5$  // *Proceedings of the 7<sup>th</sup> International Symposium on Ceramics in Medicine, Bioceramics*, 1994; 7: 151-158.
8. Standards in biomaterials testing. ISO-10993-1-14 // <http://www.standardsdirect.org/standards/standards2/StandardsCatalogue24> (sk. 05.05.2009.).
9. O' Gara J. P., Humphryes H. *Staphylococcus epidermidis* biofilms: importance and implications // *J. Med. Microbiol.*, Jul. 2001; 50(7): 582-587.
10. Trampuz A., Zimmerli W. Prosthetic joint infections: update in diagnosis and treatment // *Swiss Med. Wkly.*, 2005; 135: 243-251.
11. Handbook of bacterial adhesion / Ed. by Yuehuei H. A., Friedman R. J. - Towota: Humana Press, 2000. - Pp. 11-20.
12. Hetrick E. M., Schoenfisch M. H. Reducing implant-related infections: active release strategies // *Chem. Soc. Rev.*, 2006; 35: 780-789.