

Materiały biomedyczne. Część II: Ocena przyczepności pałeczki okrężnicy do materiałów biomedycznych w oryginalnym dynamicznym układzie przepływowym

Biomedical materials. Part II: Assessment of the adhesion of *Escherichia coli* to biomedical materials in an original dynamic flow system

Dariusz A. Paduch¹, Jerzy Niedzielski²

¹Klinika Urologii i Transplantacji Nerek Katedry Immunologii i Mikrobiologii Molekularnej Uniwersytetu Nauk Medycznych Stanu Oregon, Portland, Stany Zjednoczone (Department of Urology and Kidney Transplant, Chair of Immunology and Molecular Microbiology, University of Health Sciences of the Oregon, Portland, USA)

²Oddział Kliniczny Chirurgii i Urologii Dziecięcej, Katedra Pediatrii Zabiegowej, Uniwersytet Medyczny, Łódź (Department of Pediatric Surgery and Urology, Chair of Operative Pediatrics, Medical University, Lodz, Poland)

Streszczenie

Wstęp: Celem pracy była ocena przyczepności bakterii *Escherichia coli* do najczęściej używanych na rynku amerykańskim stentów urologicznych w dynamicznym układzie przepływowym.

Materiał i metody: Użyto następujących stentów urologicznych: 1. Silicone Stent® (Cook Urological) — stent z czystego silikonu, 2. Tecoflex® (Circon ACMI) — stent ze zmodyfikowanego poliuretanu, 3. Percuflex® (Boston Scientific) — stent wykonany z materiału chronionego patentem składającego się z polietylenu i polipropylenu z zewnętrzną warstwą heparynizowaną. Doświadczenia przeprowadzono w oryginalnej komorze przepływowej według pomysłu autorów. Stenty umieszczano w moczu zakażonym *E. coli* po wyznaczeniu optymalnej koncentracji bakterii w inokulacie, a następnie rolowano na agarze. Enumerację bakteryjną przeprowadzono na podstawie na sonifikacji, metodach enzymatycznych (aktywność β -galaktozydazy) i fluorescencyjnych (odczynniki BacLight LIVE/DEATH).

Wyniki: Oceniano liczebność i przeżywalność bakterii, wyznaczono czas osiągnięcia równowagi dynamicznej tworzenia biofilmu, optymalne stężenie bakterii w inokulacie i optymalny czas sonifikacji oraz przyczepność pałeczki okrężnicy do badanych stentów. Porównano standardowe metody enumeracji bakteryjnej z metodyką opartą na aktywności enzymatycznej β -galaktozydazy.

Wnioski: Stent Tecoflex® cechował się prawie 3-krotnie (2,6) mniejszą przyczepnością bakteryjną, natomiast stent Percuflex® miał najwyższą liczbę bakterii w biofilmie na jednostkę długości stentu. Nie stwierdzono statystycznie istotnej różnicy w przyczepności pałeczki okrężnicy do stentu silikonowego i stentu Percuflex®.

Słowa kluczowe: przyczepność bakteryjna, dynamiczny układ przepływowy, stenty urologiczne, pałeczka okrężnicy

Abstract

Background: The aim of this study was an assessment of the adhesion of the *E. coli* bacterium to urological stents most often used on the American market in dynamic flow systems.

Materials and methods: The following urological stents were examined: 1. Silicone Stent® Cook Urological — a pure silicone stent, 2. Tecoflex® (Circon ACMI) — a modified polyurethane stent, 3. Percuflex® (Boston Scientific) — a stent made of a patent-protected material consisting of polythene and polypropylene with a heparinized outer layer. The experiment was carried out in an original flow chamber according to the authors' design. The stents were put in urine infected with *E. coli* after establishing the optimal bacterium concentration in the inoculate, and were then rolled on agar. A bacterial enumeration was performed on the base of sonification, enzymatic (β -galactosidase activity) and fluorescent methods (BacLight LIVE/DEAD reagents).

Results: The time taken to achieve the dynamic balance in creating the biofilm, the optimal bacterial concentration in the inoculate as well as the optimal time of sonification were established. The number and survival rate of the bacteria and bacterial adhesion to the examined stents were assessed. Standard methods of bacterial enumeration were compared, the methodology being based on the enzymatic activity of β -galactosidase. **Conclusions:** A Tecoflex[®] stent was characterized by three times (2.6) less bacterial adhesion, while the Percuflex stent had the highest number of bacteria on the biofilm per length of unit of the stent. A statistically significant difference in the adhesion of the *E. coli* bacterium between the silicone and Percuflex stents was not found.

Key words: bacterial adhesion, dynamic flow system, urological stents, *Escherichia coli*

Wstęp

Ze względu na przynajmniej trójfazowy proces tworzenia biofilmu, nie można go opisać jednym modelem matematycznym, dlatego badania *in vitro* z jak najdokładniejszym odtworzeniem warunków *in vivo* są najlepszą metodą badania biofilmu [1].

Układy doświadczalne używane w badaniu biofilmu można podzielić na statyczne i dynamiczne.

1. Układy statyczne

Materiał badany jest zanurzony w roztworze płynu tkankowego i po ustalonym czasie doświadczenia utworzony biofilm podlega dalszej ocenie ilościowej i jakościowej. Model ten jest wystarczający do badania układów, w których biomateriał nie jest narażony na siły tarcia mechanicznego lub przepływowego [2], nie pozwala jednak na utrzymanie stałych warunków fizykochemicznych i biologicznych [3]. Układy statyczne są używane do wstępnego badania materiałów stosowanych w przemyśle (kontenery do przechowania paliw i wody, *etc.*), nie powinny jednak być stosowane do badania materiałów używanych w organizmach żywych, gdzie siły naprężeń i tarcie przyczyniają się do modelowania biofilmu [4].

2. Układy dynamiczne (przepływowe)

W takim układzie biofilm jest poddany:

- siłom tarcia mechanicznego, odtwarzającym siły działające w układzie biologicznym (na przykład tarcie zębów w badaniu biofilmu jamy ustnej);
- siłom tarcia przepływowego pomiędzy płynami biologicznymi (krew, mocz) a powierzchnią biomateriału;
- stosunkowo stałej koncentracji substancji odżywczych i stałym warunkom fizykochemicznym (mocz przepływając przez moczowód, dostarcza świeżych składników);
- stałemu usuwaniu produktów ubocznych metabolizmu (przepływający mocz).

Niezależnie od budowy i rodzaju układu badawczego, każdy eksperyment badający biofilm wymaga:

- materiału biomedycznego (często na podłożu stałym);
- roztworu płynu tkankowego;
- badanego mikroorganizmu.

Warunki fizykochemiczne w układzie moczowym obejmują:

- długość moczowodu: 25–30 cm;
- średnica moczowodu: 0,2–0,3 cm;

Introduction

Because of at least a triphase process in creating a biofilm, it is not possible to describe it with a single mathematical model, therefore *in vitro* examinations with the most precise reconstruction of *in vivo* conditions is the best method of examining a biofilm [1].

The experimental systems used in examining a biofilm can be static or dynamic.

1. Static systems

The examined material is dipped into solution of tissue liquid and the created biofilm is subject to a further quantitative and qualitative assessments after the established time. This model is good enough to study the systems in which the biomaterial is not exposed to mechanical or flow friction forces [2]. However, it does not allow one to keep constant physicochemical and biological conditions [3]. Static systems which are used in the preliminary studies of materials applied in industry (containers to keep fuels and water, *etc.*), should not however, be taken to examine materials used in living organisms, where the forces of tension and friction contribute to modelling the biofilm [4].

2. Dynamic systems (flow)

In this kind of system the biofilm is subjected to:

- mechanical friction forces, resembling the forces active in a biological system (for example: rubbing teeth in testing a biofilm for the oral cavity);
- the forces of flow friction between biological liquids (blood, urine) and the surface of the biomaterial;
- the relatively constant concentration of nutritious substances and constant physicochemical conditions (urine flowing through the ureter provides fresh components);
- the constant removal of by-products from the metabolism (flowing urine).

Regardless of the construction and kind of research system, each experiment for examining a biofilm requires:

- biomedical material (often on solid ground);
- a solution of tissue liquid;
- examined microorganisms.

Physicochemical conditions of the urinary tract:

- length of the ureter: 25–30 cm.
- diameter of the ureter: 0.2–0.3 cm.
- frequency of peristaltic wave 2–6 Hz.

- c. częstotliwość fali perystaltycznej: 2–6 Hz;
- d. prędkość fali perystaltycznej: 2–5 cm/s;
- e. temperatura: 37°C.
- f. pH moczu: 5–6,5;
- g. prędkość przepływu moczu przez moczowód: 0,5–1,5 cm³/s.

Zakładając produkcję 24-godziną moczu na 1500 ml i dzieląc ją na dwa moczowody, otrzymamy objętość przepływu moczu przez moczowód około 750 ml na 24 godziny. Mocz przepływa przez moczowód dzięki fali perystaltycznej, a prędkość przepływu nie jest stała. Opierając się na pomiarach doświadczalnych i teoretycznym modelu otwartej rurki, można założyć, że prędkość przepływu moczu przez moczowód wynosi 0,5–1,5 cm³/s (lub ml) [5].

Moczowód zbudowany jest z mięśniówki i śluzówki, którą pokrywa nabłonek przejściowy. W nabłonku tym znajdują się także makrofagi i mastocyty. Ciało obce (stent) w moczowodzie poddane jest nie tylko działaniu moczu z jego organicznymi i nieorganicznymi składnikami, ale także działaniu substancji i białek produkowanych przez białe i czerwone ciała, płytki krwi oraz produkty lokalnej odpowiedzi tkankowej. Dlatego eksperyment badający interakcje pomiędzy biomateriałem a moczowodem musi uwzględnić skomplikowane warunki tarcia wynikające z dynamiki płynów (mocz), warunki fizykochemiczne moczu, a także wpływ komórek w moczowodzie.

Materialy

Stenty

W prezentowanej pracy autorzy badali najczęściej używane, powszechnie dostępne na rynku materiały do produkcji stentów urologicznych [6]:

1. Stent silikonowy (Silicone Stent®), produkowany przez firmę Cook Urological, z siedzibą w Spencer, IN, Stany Zjednoczone — stent z czystego silikonu;
2. Tecoflex®, stent produkowany przez firmę Circon ACMI, z siedzibą w Stamford, CT, Stany Zjednoczone — stent ze zmodyfikowanego poliuretanu;
3. Percuflex®, stent produkowany przez firmę Boston Scientific z siedzibą w Natick, MA, Stany Zjednoczone — stent wykonany z materiału chronionego patentem składającego się z polietylenu i polipropylenu z zewnętrzną warstwą heparynizowaną HydroPlus®.

Stenty zostały zakupione z środków własnych i przechowywane w oryginalnych sterylnych opakowaniach.

Mocz

Mocz od zdrowego ochotnika został zebrany na lodzie, a następnie próbkę o objętości 10 ml odwirowano w wirówce laboratoryjnej z prędkością 2,500 obr./min przez 5 minut. Supernatant usunięto, a opad zawieszono w kropli moczu i przygotowano preparat. Preparat świeżego moczu badano przy użyciu mikroskopu świetlnego pod powiększeniem 400 ×. Do badań użyto wyłącznie moczu z negatywnym wynikiem badania na obecność azotanów, białych i czerwonych ciałek krwi. Wykonano także posiewy 5 ml moczu z każdej próbki na obecność bakterii i grzybów przez 5 dni. Jeżeli posiew był pozy-

- d. speed of peristaltic wave 2–5 cm/sec.
- e. temperature — 37°C.
- f. pH of urine: 5–6.5.
- g. the speed of urine flow through the ureter: 0.5–1.5 cc/s.

Assuming the 24-hour production of urine to be 1500 ml and dividing it between two ureters, one will obtain a volume of about 750 ml of urine flowing through one ureter for 24 hours. Urine runs through the ureter thanks to a peristaltic wave, and the speed of the flow is not constant. Being based on experimental measurements and a theoretical model of the opened tube, the flow speed of urine through the ureter is estimated to be 0.5–1.5 cc/s [5].

The ureter is made of muscles and mucous membrane which is covered with a transcendent epithelium. Mastocytes and macrophages can be found in this epithelium. A foreign body (stent) in the ureter is subjected not only to urinary action with its organic and non-organic elements, but also to the action of substances and proteins produced by white and red blood cells, platelets and products due to local tissue response.

Therefore, the experiment examining interactions between a biomaterial and the ureter must consider the complicated conditions of friction resulting from dynamics of liquids (urine), the physicochemical conditions of urine as well as influence of cells in the ureter.

Materials

Stents

We have examined in this study materials widely available on the market and most often used for the production of urological stents [6].

1. Silicone Stent® — produced by the Cook Urological company, located in Spencer, IN, USA — a stent of pure silicone.
2. Tecoflex® — produced by the Circon ACMI company, located in Stamford, CT, USA — a stent of modified polyurethane.
3. Percuflex® — produced by the Boston Scientific company, located in Natick, MA, USA — a stent made of a patent-protected material consisting of polythene and polypropylene with a heparinized outer layer, HydroPlus®.

The stents were purchased at the authors' expense and were kept in their original sterile wrappings.

Urine

Urine of a healthy volunteer was taken on ice then a 10ml specimen was spun in the laboratory centrifuge at a speed of 2,500 turns/min for 5 minutes. The supernatant was removed, the precipitate was hung in the drop of urine for the microscope preparation. The preparation of fresh urine was examined under a lit optical microscope with 400 × magnification. Only urine with negative examination results for the presence of nitrates, white blood cells and red blood cells was used in the study. Bacterial and fungal cultures were made from 5 ml of each urine specimen for 5 days. If the culture was posi-

tywny (niezależnie od liczby kolonii), próbka nie była brana pod uwagę w analizie wyników.

Materiał zakaźny

Pałeczkę okrężnicy (*Escherichia coli* — *E. coli*) wybrano do badań ze względu na jej znaczenie kliniczne w zakażeniach układu moczowego, a także duże doświadczenie w jej enzymatologii i biologii. Wszystkie eksperymenty przeprowadzono z użyciem tego samego szczepu bakteryjnego, który uzyskano z pracowni mikrobiologicznej Wojskowego Szpitala Klinicznego w Portland od pacjenta z zakażonym stentem po leczeniu kamicy nerkowej i septycznym zapaleniu bakteryjnym nerki. Próbka była zachowana w 30-procentowym glicerolu i zamrożona. Przed każdym nowym eksperymentem próbka była hodowana na agarze przez 24 godziny, po czym zawieszona i hodowana w medium płynnym Luria-Bertani (LB) przez kolejne 24 godziny.

Przygotowanie medium bakteriologicznego

Podłoże LB wybrano ze względu na powszechną dostępność, łatwość przygotowania i modyfikacji oraz dobre doświadczenia w laboratoriach mikrobiologicznych i genetycznych pracujących z pałeczką okrężnicy.

Do przygotowania 1 litra podłoża LB odważono: 10,0 g Tryptone (Difco 0123), 5,0 g ekstraktu drożdży (Yeast Extract Difco 0127), 10,0 g NaCl i 5,0 g laktozy. Do czystego szklanego pojemnika przepłukanego odjonizowaną wodą dodano: wszystkie odczynniki, 1 litr odjonizowanej wody i 0,5 ml 4N Sodium Hydroxide, a następnie mieszano do rozpuszczenia przy użyciu mieszadła magnetycznego w temperaturze 30°C. Podłoże LB rozdzielono do: 20 probówek (20 ml) po 5 ml, 4 kolb Erlenmeyera (500 ml) po 100 ml, 1 dużego pojemnika (750 ml) — 500 ml. Naczynia laboratoryjne przykryto plastykiem laboratoryjnym i aluminium i wysterylizowano przez 20 min w autoklawie w temperaturze 121°C, a przechowywano w temperaturze pokojowej lub chłodziarce.

Do przygotowania 1 litra agaru LB odważono: 10,0 g Tryptone (Difco 0123), 5,0 g ekstraktu drożdży (Yeast Extract Difco 0127), 10,0 g NaCl, 5,0 g laktozy i 15,0 g agaru. Do czystego szklanego pojemnika przepłukanego odjonizowaną wodą dodano: wszystkie odczynniki, 1 litr odjonizowanej wody i 0,5 ml 4N Sodium Hydroxide, a następnie mieszano do rozpuszczenia przy użyciu mieszadła magnetycznego w temperaturze 30°C z kłębkiem waty w szyjce kolby Erlenmeyera. Agar LB rozlano do płytek Petriego i pozostawiono do zastygnięcia, a następnie płytki opisano (dzień wylania i numery seryjne użytych odczynników). Płytki inkubowano w temperaturze 37°C przez 24 godziny, odrzucono płytki z jakimkolwiek wzrostem bakteryjnym. Płytki przechowywano w chłodziarce w temperaturze 4°C maks. przez 3 miesiące.

Kontrola zanieczyszczenia bakteriologicznego

Szklano laboratoryjne, odczynniki i komorę przepływową wysterylizowano w autoklawie. Wszystkie eksperymenty przeprowadzono w laboratoriach Katedry Immunologii i Mikrobiologii Molekularnej Uniwersytetu

(independent of the number of colonies) the sample was not taken into consideration in the analysis of the results.

Contagious material

Escherichia coli was chosen for this study because of its clinical significance in infections of the urinary tract, as well as for the wide experience already gained in its enzymatology and biology. All experiments were carried out with use of the same bacterial strain obtained from the microbiological laboratory of the Military Clinical Hospital in Portland, from a patient with an infected stent after being treated for nephrolithiasis and septic bacterial nephritis. The sample was preserved in 30% glycerol and frozen. Before every new experiment, the sample was bred on agar for 24 hours, then hung and bred in a Luria-Bertani (LB) fluid medium for the following 24 hours.

Preparing the bacteriological medium

The LB base was chosen because it is widely available, easy to prepare and modify and because of the good experience in microbiological and genetic laboratories of working with *Escherichia coli*.

10.0 g of Tryptone (Difco 0123), 5.0 g of yeast extract (Yeast Extract Difco 0127), 10.0 g of NaCl and 5.0 g of the Lactose were weighed out to prepare 1 litre of the LB base. All reagents, 1 litre of deionised water and 0.5 ml of 4N Sodium Hydroxide were added to a clean glass container rinsed out with deionised water and mixed up until dissolving in at 30°C using a magnetic mixer. The LB base was divided among: 20 test tubes (20 ml) each with 5 ml, 4 Erlenmeyer tubes (500 ml) each with 100 ml and one big container (750 ml) with 500 ml. The laboratory vessels were covered with laboratory plastic and aluminium and were sterilized for 20 min in an autoclave at a temperature of 121°C, and were stored at room temperature or in the refrigerator.

10.0 g of Tryptone (Difco 0123), 5.0 g of yeast extract (Yeast Extract Difco 0127), 10.0 g of NaCl and 5.0 g of the lactose were weighed out to prepare 1 litre of the LB base. All reagents, 1 litre of deionised water and 0.5 ml of 4N Sodium Hydroxide were added to a clean glass container rinsed out with deionised water and mixed up until dissolving in at 30°C using a magnetic mixer with a cotton wool ball in the Erlenmeyer tube neck.

LB agar was poured out into petri dishes and left until it solidified into a gel. Then the dishes were labelled with the date of pouring and the serial numbers of the reagents used. The dishes were incubated at 37°C for 24 hours and dishes with any bacterial growth were disposed of. The remaining dishes were stored in a refrigerator in at a maximum temperature of 4°C for 3 months.

Control of bacteriological pollution

The laboratory glassware, reagents and the flow chamber were sterilized in an autoclave. All experiments were carried out in the laboratories of the Chair of Immunology and Molecular Microbiology of the University of Health Sciences in Portland, Oregon, under the direc-

Nauk Medycznych Stanu Oregon w Portland, w pracowni Profesora Freda Heffrona, w latach 1999–2000. Materiał zakaźny opracowano i niszczone zgodnie z zaleceniami Narodowego Instytutu Zdrowia (NIH, *National Institute of Health*) i wewnętrznymi przepisami katedry. Praca ta została w całości sfinansowana z funduszy Katedry Immunologii i Mikrobiologii Molekularnej oraz funduszy własnych autorów bez jakiegokolwiek finansowania ze strony przemysłu farmaceutycznego. Ze względu na czysto eksperymentalny charakter badań praca nie podlegała ocenie Komisji Etyki Badań Naukowych, poza wymogami Komisji dotyczącymi stosowania bezpiecznych metod laboratoryjnych.

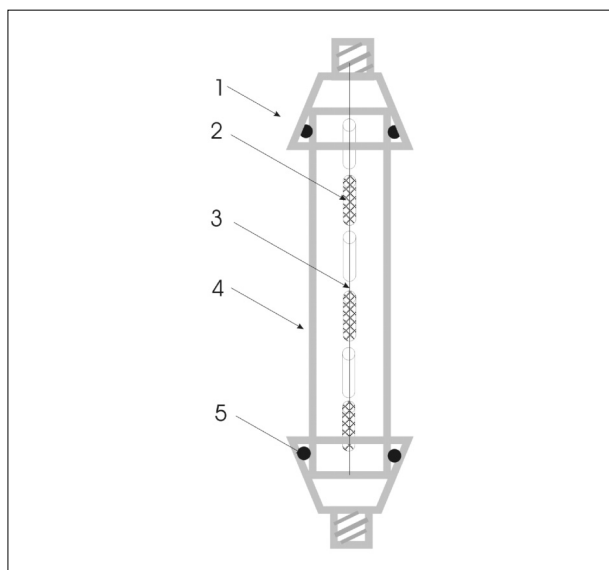
Metody

Komora przepływowa

Do budowy komory przepływowej (ryc. 1) użyto: rurki szklanej o długości 30 cm i wewnętrznej średnicy 7 mm (Pyrex®), 2 strzykawek polietylenowych (Luer) o objętości 3 ml, platynizowanej rurki silikonowej o wewnętrznej średnicy 4 mm (Cole-Palmer®, nr katalogowy P-95802-07), złącz polietylenowych o wewnętrznej średnicy 4 mm (Cole-Palmer®) oraz kleju silikonowego medycznego (General Electrics®, nr katalogowy RTV 118).

Opis budowy komory

Strzykawki przecięto w połowie długości i jedną z nich (dolną) sklejono ze szklaną rurką. Drugą strzykawkę doklejono po zawieszeniu stentów w komorze. Do każdej komory przepływowej dodano trójramienny podzielnik przepływu z dodatkowym portem do pobierania próbek. Sterylny mocz umieszczono w dwulitrowych pojemnikach z korkiem silikonowym, odpowietrznikiem z filtrem bawełnianym i rurką polietylenową, którą połączono przez



Rycina 1. Strzykawka: 1) koniec strzykawki Luer, 2) stent, 3) nić chirurgiczna, 4) rurka szklana Pyrex, 5) uszczelka silikonowa

Figure 1. Syringe: 1) end of the Luer syringe, 2) stent, 3) surgical suture, 4) Pyrex glass pipe, 5) silicone gasket

tion of Professor Fred Heffron during the years 1999–2000. Any contagious material was found and destroyed according to the recommendations of the National Institute of Health (NIH) and internal regulations of the Chair.

This work was financed from the funds of the Chair of Immunology and Molecular Microbiology and the authors' own resources without any financial support from the pharmaceutical industry.

Due to the purely experimental character of this study, it was not evaluated by the Committee of Research Ethics, apart from following the Committee's requirements regarding the application of safe laboratory methods.

Methods

Flow chamber

The following parts were used in the construction of flow chamber (Fig. 1): a glass pipe of 30 cm in length and an internal diameter of 7 mm (Pyrex®), 2 polyethylene syringes (Luer lock) of 3 ml volume, a platinum-covered silicone pipe with an internal diameter of 4 mm (Cole-Palmer®, catalogue no. P-95802-07), polyethylene junctions with an internal diameter of 4 mm (Cole-Palmer®), silicone medical glue (General Electrics®, catalogue no. RTV 118).

Description of the chamber construction

The syringes were cut in the middle in two and the lower part was glued to the glass pipe. The second syringe was glued after the stents were hung in the chamber. A three-arm flow distributor with an additional port for taking samples was added to each flow chamber. Sterile urine was collected in two-litre containers with a silicone cork, with a cotton filter and a silicone pipe which was connected via the pulsating pump to the flow chamber by the silicone tube. A sonographic-laser gauge was placed on the tube. Refuse from the flow chamber was carried to a two-litre container, and next to the Microbiology Chair's contagious refuse collector. Each flow chamber was built with a microbiological air-blower with positive pressure. The experiments were carried out in the microbiological chamber at room temperature.

Description of experiment

1. Preparation of stents

Stents were cut into 1.5 cm length pieces with sterile scissors and were hung on sterile nylon thread. In order to get similar physicochemical conditions they were arranged according to 1–2–3–1–2–3... pattern and were placed in the sterile flow chamber vertically.

2. Method of infecting (inoculating) the flow chamber

The flow chamber was filled up with 10 ml of bacterial suspension (4×10^8 bacterium/ml) in a fluid LB medium with 5% lactose (GIBCO 12795084), and after the incubation period sterile urine with the medium (in a 5:1 proportion) was put through the flow chamber with use of a pulsating pump with 12 impulses/minute and a mean speed 0.8 ml/min for 24 hours (Fig. 2).

pompę pulsacyjną z komorą przepływową wężykiem silikonowym. Na wężyku umieszczono sonograficzno-laserowy miernik przepływu. Odpadki z komory przepływowej zlewano do 2-litrowego pojemnika, a następnie do zbiornika na odpadki zakaźne Katedry Mikrobiologii. Każdą komorę przepływową budowano w nawiewie mikrobiologicznym z dodatnim ciśnieniem. Eksperymenty przeprowadzono w komorze mikrobiologicznej w temperaturze pokojowej.

Opis eksperymentu

1. Przygotowanie stentów

Stenty pocięte sterylnymi nożyczkami na 1,5-centymetrowe kawałki zawieszono na sterylnej nici nylonowej. Aby uzyskać podobne warunki fizykochemiczne, ułożono je według wzoru 1–2–3–1–2–3... i umieszczono pionowo w sterylnej komorze przepływowej.

2. Metodyka zakażenia (inokulacji) komory przepływowej

Komorę przepływową wypełniano 10 ml zawiesiny bakteryjnej (4×10^8 bakterii/ml) w medium płynnym LB z 5-procentową laktozą (GIBCO 12795084), a po okresie inkubacji sterylnej moczu z medium (w proporcji 5:1) przepuszczano przez komorę przepływową za pomocą pompy pulsacyjnej z 12 impulsami na minutę i prędkością średnią 0,8 ml/min przez 24 godziny (ryc. 2).

3. Opracowanie materiału

Po 24 godzinach stenty wyjmowano z komory i przepłukiwano dwukrotnie roztworem NaCl (PBS, *phosphate buffered saline*; Life Technologies 14190151), aby usunąć mocz. Stenty podzielono na dwie grupy w celu dalszej obróbki.

4. Metoda rolowania stentów w celu policzenia (enumeracji) bakterii

Stenty rolowano na LB agarze, a płytki agarowe inkubowano w temperaturze 37°C przez 24 godziny. Kolonie bakterii liczono na każdej z płytek.

5. Enumeracja bakteryjna – sonifikacja

Stenty umieszczano na lodzie w sterylnych 2-mililitrowych probówkach z przykrywką, dodawano 1,5 ml roztworu roboczego lub 1,5 ml PBS i umieszczano w kąpielii sonifikacyjnej. Sonifikatora laboratoryjnego (60 Hz, 1,5 W) używano przez 30 s.

6. Pomiar aktywności β -galaktozydazy przy użyciu o-Nitrofenyl- β -galaktopyranozydu

Roztwór roboczy składał się z 40 ml 1M dithiothreitolu w 100 ml buforu enzymatycznego (61 mM Na_2HPO_4 , 39 mM NaH_2PO_4 , 10 mM KCl, 10 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ w 1000 ml H_2O). Do każdej probówki dodawano 4 krople chloroformu i 2 krople 0,1-procentowego siarczanu sodku dodecylu (SDS, *sodium dodecyl sulfate*), a następnie probówki worteksowano przez 15 s. Po wyjęciu z roztworu stenty niszczone, a próbki inkubowano przez 10 min w temperaturze pokojowej. Do każdej próbki dodawano 0,4 ml roztworu ONPG (o-nitrofenyl-BD-galaktopyranozyd), mieszano, a następnie inkubowano w 27°C

3. Processing of the material

The stents were taken out of the chamber after 24 hours and were rinsed twice with phosphate buffered saline (PBS, Life Technologies 14190151) in order to remove the urine. The stents were then divided in two groups for further processing.

4. Method of rolling the stents in order to count (enumerate) the bacteria

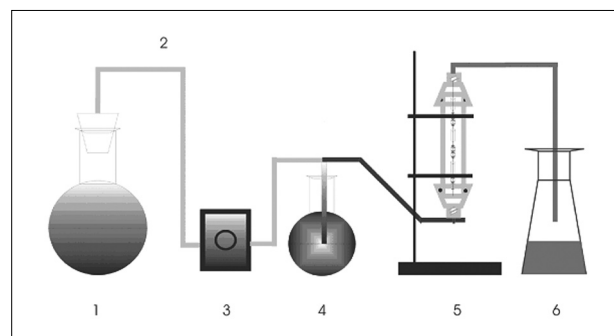
The stents were rolled in LB agar and the agar dishes were incubated at a temperature of 37°C for 24 hours. Bacteria colonies were then counted in each dish.

5. Bacterial enumeration – sonification

Stents were put on ice in sterile 2 ml test tubes with lids, to which 1.5 ml of working solution (RR) or 1.5 ml of PBS were added and next were put in the sonic bath. A laboratory sonicator (60 Hz, 1.5 in) was used for 30 sec.

6. Measurement of the β -galactosidase activity using o-nitrophenyl- β -galactopyranoside

Working solution consisted of 40 ml of 1M dithiothreitol in 100 ml enzymatic buffer (61 mM Na_2HPO_4 , 39 mM NaH_2PO_4 , 10 mM KCl, 10 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ mm in 1000 ml of H_2O). 4 drops of chloroform and 2 drops of 0.1% sodium dodecyl sulphate (SDS) were added to every test tube, then the test tubes were vortexed for 15 secs. After taking them out from the solution the stents were then destroyed, and the samples were incubated for 10 min. at room temperature. 0.4 ml of ONPG solution was added to every sample, mixed up and incubated at 27°C. RR and the *E. coli* suspension were used as the negative and positive control. The reaction was stopped after 2 hours of incubation by adding 1 ml of 1 M sodium carbonate and the samples were brought to the spectrophotometric room. The absorbance of every sample was measured in light distances of 420 nm (OD420) and 550 nm (OD550), using disposable spectrophotometric trays. Assuming that



Rycina 2. Schemat przepływu: 1) sterylne moczu, 2) przewody silikonowe platynizowane, 3) pompa pulsacyjna, 4) zbiornik ze świeżą kulturą *E. coli*, 5) komora przepływowa, 6) zbiornik na zużyty mocz i zawieszoną bakterii

Figure 2. Diagram of the flow: 1) sterile urine, 2) silicone platinumized tubes, 3) pulsating pump, 4) container with fresh *E. coli* culture, 5) flow chamber, 6) container for used urine and suspension of bacteria

roztworu roboczego i zawiesiny *E. coli* używano jako negatywnej i pozytywnej kontroli. Reakcję przerywano po 2 godzinach inkubacji, dodając 1 ml 1M węglańcu sodu, a próbki przenoszono do pokoju spektrofotometrycznego. Absorbancję każdej próbki mierzono przy długościach światła 420 nm (OD420) i 550 nm (OD550), używając jednorazowych kuwet spektrofotometrycznych. Zakładając, że aktywność β -galaktozydazy jest proporcjonalna do liczby bakterii w jednostce objętości w modelu permeabilizowanym (otwarte pory błony komórkowej), całkowitą aktywność β -galaktozydazy w próbce obliczano według wzoru: aktywność próbki = $100 \times [\text{OD}420 - (1,75 \times \text{OD}550)]$. Każdy z eksperymentów powtarzano 3-krotnie, a uzyskane wartości uśredniano.

7. Metody fluorescencyjne

Stenty umieszczano w sterylnych polietylenowych probówkach (Corning Cryogenic 2,0 ml) z 1,5 ml PBS i poddawano sonifikacji przez 30 s. w sonifikatorze laboratoryjnym (60 Hz, 1,5 W). Do oznaczenia liczebności i metabolizmu bakteryjnego użyto zestawu odczynników BacLight LIVE/DEATH. Preparat przygotowywano, mieszając 5 μ l zawiesiny bakteryjnej ze stentu (po sonifikacji) z 5 μ l roztworu BacLight. Preparaty (trzy z każdej próbki) analizowano w mikroskopie epifluorescencyjnym (NIKON) z filtrem Omega-5717 lub spektrofotometrem fluorescencyjnym (BioRad). Notowano całkowitą liczbę i procent żywych bakterii.

8. Ustalenie negatywnych i pozytywnych kontroli dla doświadczeń

Zawiesinę bakterii *E. coli* przenoszono do 10-mililitrowej próbki i pod kontrolą spektrofotometru rozcieńczano sterylnym medium LB do gęstości optycznej równej koncentracji 4×10^8 bakterii/ml. Następnie poprzez seryjne rozcieńczenia 1:10 uzyskano różne stężenia bakterii. Rozcieńczenia i pomiary spektrofotometryczne przeprowadzono w temperaturze 4°C (na lodzie). Po 5 μ l z każdego rozcieńczenia przenoszono na szkiełko i barwiono metodą Grama. Następnie określono liczebność bakterii na ml w każdym rozcieńczeniu w mikroskopie świetlnym ($\times 1000$). Tych samych roztworów użyto do ustalenia krzywych aktywności β -galaktozydazy i kontroli metod fluorescencyjnych.

9. Ustalenie optymalnych warunków tworzenia biofilmu

W fazie wstępnej badań ustalono krzywe przyczepności bakteryjnej poprzez manipulację czasu trwania eksperymentu, a także badając różne koncentracje bakterii w inokulacie.

10. Optymalny czas eksperymentu (dynamiczna równowaga biofilmu)

W tym eksperymencie użyto stentu silikonowego pociętego na 1,5-centymetrowe kawałki. Komorę przepływową wypełniono 10 ml zawiesiny bakteryjnej (4×10^8 bakterii/ml) w medium płynnym LB z 5-procentową laktozą (GIBCO 12795084). Po okresie inkubacji ste-

the β -galactosidase activity is proportional to the number of bacteria in a volume unit of the permeabilised model (open pores of the cell membrane) the total activity of β -galactosidase in the sample was calculated according to the following equation: the activity of the sample = $100 \times [\text{OD}420 - (1.75 \times \text{OD}550)]$. Every experiment was repeated three times and the mean values were accepted.

7. Fluorescent methods

The stents were put into sterile polyethylene test tubes (Corning Cryogenic 2.0 ml) with 1.5 ml of PBS and underwent 30 sec sonification in the laboratory sonicator (60 Hz, 1.5 W). The number of bacteria and their metabolism were measured with use of the BacLight LIVE/DEAD reagents set. A preparation was made of 5 μ l of bacterial suspension of the stent (after sonification) mixed with 5 μ l of BacLight solution. Preparations (three of each sample) were analyzed in an epifluorescent microscope (NIKON) with an Omega-5717 filter or fluorescent spectrometer (BioRad). The total number and percentage of living bacteria were counted.

8. Establishing negative and positive controls for experiments

The suspension of the *E. coli* bacterium was put into a 10 ml test tube and under control of spectrophotometer was dissolved with a sterile LB medium to the optical thickness equal to a 4×10^8 bacterium/ml concentration. Next different concentrations of the bacteria were created through serial solutions 1:10. Solutions and spectrophotometric measurements were carried at a temperature of 4°C (on ice). 5 μ l of each solution was put onto glass and prepared by Gram's method. The number of the bacteria in ml in each solution was counted under a light optical microscope ($\times 1000$). The same solutions were used to establish levels of β -galactosidase activity and as a control of the fluorescent methods.

9. Establishing optimal conditions for creating the biofilm

Levels of bacterial adhesion were established in the preliminary phase of study through manipulation of the time of experiment, as well as examining different concentrations of the bacterium in the inoculate.

10. Optimal time of experiment (dynamic balance of the biofilm)

A silicone stent cut into 1.5 cm pieces was used in this experiment. The flow chamber was filled with 10 ml of the bacterial suspension (4×10^8 bacterium/ml) in a liquid LB medium with 5% lactose (GIBCO 12795084). After incubation, sterile urine with the medium (5:1) was put through the flow chamber with use of the pulsating pump with 0.8 ml/min speed for 24 hours. After intervals of 1, 2, 4, 8, 12, 18, 24 hours, the stents were taken out of the chamber and were rinsed twice with phosphate buffered saline (PBS, Life Technologies 14190151). Stents were prepared β -galactosidase activity levels were established as described in part 6.

rylno moczu z medium (5:1) przepuszczono przez komorę przepływową za pomocą pompy pulsacyjnej z prędkością 0,8 ml/min przez 24 godziny. Po 1, 2, 4, 8, 12, 18, 24 godzinach stenty wyjmowano z komory i płukano 2-krotnie roztworem zbuforowanego NaCl (PBS, Life Technologies 14190151). Stenty opracowywano według podanego powyżej protokołu sonifikacji. Mierzono aktywność β -galaktozydazy i wyznaczano krzywe jak w punkcie 6.

11. Wyznaczenie optymalnej koncentracji bakterii w inokulacji

Po zakażeniu komory 10 ml zawiesiny bakteryjnej o stężeniach: 1×10^5 , 4×10^8 , 1×10^{10} pobrano 1 ml mieszaniny moczu i bakterii z odpływu komory przepływowej. Objętość 1 ml rozcieńczonej 1:10 zawiesiny każdej próbki wylewano na LB agar, inkubowano w temperaturze 37°C i określono po 12 i 24 godzinach. Do oznaczenia aktywności β -galaktozydazy metodą ONPG opisaną powyżej używano 1 ml rozcieńczonej próbki. Następnie wyznaczono krzywe stężenia bakterii w odpływie w zależności od koncentracji bakterii w inokulacji.

12. Wyznaczenie optymalnego czasu sonifikacji

Kawałki stentów (1,5 cm) umieszczono w komorze przepływowej i po 24 godzinach wyjęto i przepłukano 2-krotnie roztworem zbuforowanego NaCl (PBS, Life Technologies 14190151). Stenty umieszczono na lodzie w sterylnych 2-mililitrowych mikroprobówkach z przykrywką. Do probówek dodano 1,5 ml roztworu roboczego lub PBS i umieszczono w kąpeli sonifikacyjnej. Sonifikatora używano przez 10, 20, 30, 60 i 120 sekund. Supernatant opracowano według opisaną powyżej metody mierzenia aktywności β -galaktozydazy lub wylano na LB agar i inkubowano przez 24 godziny w celu wyznaczenia wpływu czasu sonifikacji na aktywność β -galaktozydazy i przeżywalność bakterii.

Analiza statystyczna

Dane wprowadzono do arkusza kalkulacyjnego Excel 2000, a następnie opracowano przy użyciu programu statystycznego SPSS v. 11.0.1. (test *t*-Studenta, test ANOVA i moduł graficzny, minimalne $p < 0,05$).

Wyniki

1. Ocena liczebności bakterii (enumeracja) metodą rolowania na płytce agarowej.

Analiza 10 płytek po 12 i 24 godzinach inkubacji nie pozwoliła na numerację, ponieważ kolonie zlewały się ze sobą. W celu potwierdzenia hipotezy, iż rolowanie pozostawia znaczną liczbę bakterii na powierzchni stentu, 10 kawałków stentu po 24 godzinach eksperymentu rolowano jednorazowo na płytkach agarowych, a materiał biologiczny poddawano sonifikacji w 1 cm³ PBS i ponownemu rolowaniu. Po sonifikacji materiał rozcieńczano i posiewano na płytki, a wzrost liczono po 24 godzinach inkubacji w temperaturze 37°C. Stenty ponownie rolowano na płytkach i liczono kolonie (ryc. 3, tab. I).

11. Establishing the optimal bacterium concentration in the inoculate

After infecting the chamber with 10 ml of the bacterial suspension with the following concentrations; 1×10^5 , 4×10^8 , 1×10^{10} , 1 ml of the mixture of urine and bacterium was taken from the outflow of the flow chamber. 1 ml of each sample suspension solute 1:10 was poured out on the LB agar, incubated at 37°C and counted after 12 and 24 hours. 1ml of the solute sample was used to mark the β -galactosidase activity using the ONPG method described above. Levels of the bacterium concentration in the outflow depending on the bacterium concentration in inoculate were then established.

12. Establishing the optimal time of sonification

Pieces of the stents (1.5 cm) were placed in the flow chamber and then taken out and rinsed out twice with a solution of phosphate buffered saline (PBS, Life Technologies 14190151). Stents were placed on ice in sterile 2 ml microtubes with lids. 1.5 ml of working solution or PBS was added to test tubes and they were placed in the sonic bath. A sonicator was used for 10, 20, 30, 60 and 120 seconds. The supernatant was prepared according to the β -galactosidase activity measurement method described above or was poured out on LB agar and incubated for 24 hours in order to establish the influence on the time of sonification of β -galactosidase activity as well as the survival of the bacteria.

Statistical analysis

Data were calculated using Excel 2000, and were then worked out using the statistical program SPSS v. 11.0.1. (*t*-Student test, ANOVA and the graphical module, the p minimum < 0.05).

Results

1. An assessment of the number of bacteria number using the method of rolling on an agar dish.
An analysis of 10 dishes after 12 and 24 hours of incubation did not permit enumeration because the colonies had already merged with each other. In order to prove the hypothesis that rolling leaves a considerable number of bacteria on the stent's surface, 10 pieces of stent were rolled once on the agar dishes after 24 hours of the experiment. The biological material was then submitted to sonification in 1 cc of PBS and rolled again. After sonification, the material was dissolved and poured into dishes, and the growth was counted after 24 hours incubation at 37°C. Stents were rolled on petri dishes once more and colonies were counted (Fig. 3 and Table I).
2. The establishment of the time of reaching the dynamic balance in creating the biofilm with the use of a pulsating pump with an average speed of 0.8 ml/min (Fig. 4).
3. The establishment the optimal bacterium concentration in the inoculate (Fig. 5).
4. The establishment the optimal time of sonification (Fig. 6).

2. Wyznaczenie czasu osiągnięcia równowagi dynamicznej tworzenia biofilmu przy użyciu pompy pulsacyjnej ze średnią prędkością 0,8 ml/min (ryc. 4).
3. Wyznaczenie optymalnego stężenia bakterii w inokulacji (ryc. 5).
4. Wyznaczenie optymalnego czasu sonifikacji (ryc. 6).
5. Porównanie standardowych metod enumeracji bakteryjnej z metodyką opartą na aktywności enzymatycznej β -galaktozydazy (ryc. 7).
6. Ocena liczebności i przeżywalności *E. coli* przy użyciu fluorochromów BacLight LIVE/DEATH (ryc. 8).
7. Przyczepność pałeczki okrężnicy do badanych stentów (ryc. 9).

Stent Tecoflex[®] cechował się prawie 3-krotnie (2,6) mniejszą przyczepnością bakteryjną, natomiast stent Percuflex[®] miał najwyższą liczbę bakterii w biofilmie na jednostkę długości stentu. Nie stwierdzono statystycznie istotnej różnicy między przyczepnością pałeczki okrężnicy do stentu silikonowego i stentu Percuflex[®].

Dyskusja

Pomimo wagi problemu, w piśmiennictwie można spotkać niewiele prac analizujących interakcje pomiędzy biomateriałem i mikroorganizmem w układzie moczowym [6, 7]. Większość autorów posłużyła się statycznym modelem, w którym stenty zanurzone są w roztworze sztucznego moczu zmieszanego z bakteriami [8]. Nie odtwarza on nawet w przybliżeniu warunków panujących *in vivo*, ponieważ nie istnieją w nim siły tarcia i przepływu modelujące powstanie biofilmu. Dlatego jednym z celów autorów niniejszej pracy było opracowanie modelu przepływowego odtwarzającego warunki fizjologiczne. Zastosowana w opisywanym modelu pompa pulsacyjna spowodowała sinusoidalną zmianę prędkości przepływu moczu, zbliżoną do warunków w moczowodzie, gdzie perystaltyka ściany moczowodu powoduje od 6 do 12 zmian prędkości na minutę. Zalety modelu dynamicznego w badaniu biofilmu są dobrze udokumentowane w literaturze medycznej [9]. Jansen i wsp. badając biofilm w drogach żółciowych, wykazali, że eksperymenty przeprowadzone w modelu dynamicznym mogą dać wyniki przyczepności bakteryjnej istotnie różne od modelu statycznego [10].

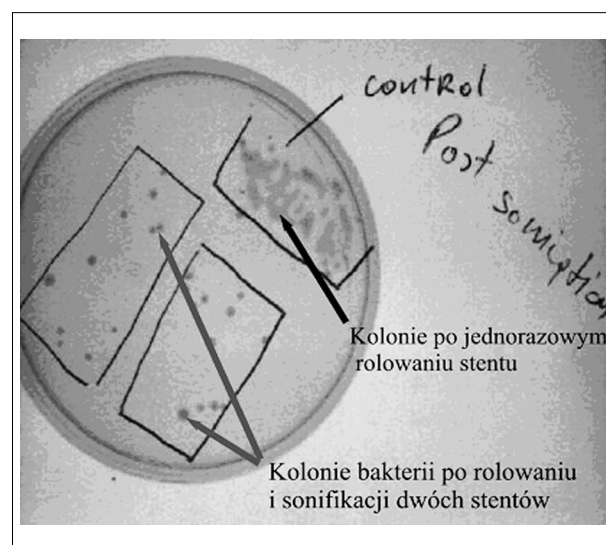
W wielu doświadczeniach biomateriał był rolowany na agarze i autorzy liczyli pojedyncze kolonie bakteryjne [11]. Metody tej nie powinny się stosować w badaniach naukowych nad biofilmem w układach z wysoką

5. A comparison of the standard methods of bacterial enumeration with β -galaktozydase enzymatic activity based methodology (Fig. 7).
6. An assessment of the total number and surviving number of *E. coli* bacterium using BacLight LIVE/DEATH fluorochroms (Fig. 8).
7. The adhesion of the *E. coli* bacterium to the examined stents (Fig. 9).

The Tecoflex[®] stent showed almost three times (2.6) less bacterial adhesion, while Percuflex stent had the highest number of bacteria on the biofilm per length of unit of the stent. A statistically significant difference was not found between adhesion of the *E. coli* bacterium to the silicone stent and the Percuflex stent.

Discussion

In spite of the importance of the problem, there is a limited number of reports in the literature analysing interactions between biomaterial and microorganisms in the urinary tract [6, 7]. The majority of authors have used



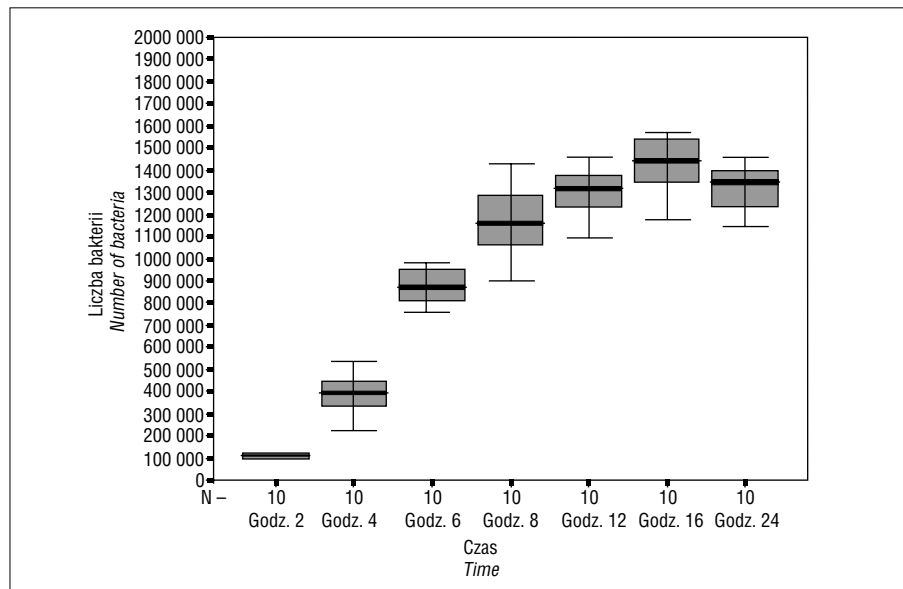
Rycina 3. Zdjęcie płytki Petriego po 24 godzinach inkubacji. Control — wzrost kolonii po jednorazowym rolowaniu. U dołu: wzrost z tego samego stentu po dwukrotnym rolowaniu i sonifikacji

Figure 3. Photo of the Petri dish after 24 hours incubation. Control — growth of the colony after single rolling. At the bottom: growth from the same stent after rolling twice and sonification

Tabela I. Porównanie liczebności bakterii (enumeracja) określonej metodą rolowania na płytce agarowej i sonifikacji ($p < 0,05$)
Table I. Comparison of the number of bacteria (enumeration) counted by rolling on agar dish and by sonification ($p < 0.05$)

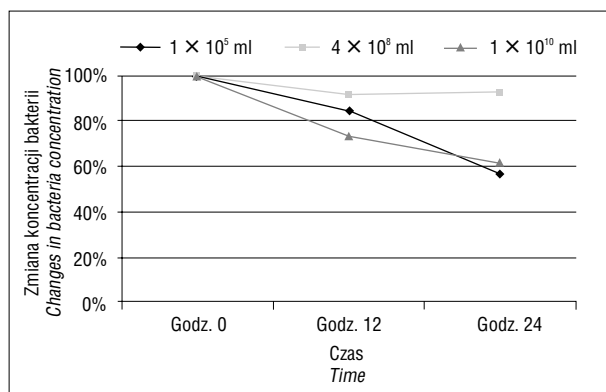
Liczba kolonii Number of colonies	Po jednorazowym rolowaniu After sonification (solution), rolled	Po sonifikacji (roztwór), stent nierolowany Sonification (solution), non-rolled stent	Po sonifikacji (roztwór), stent rolowany Sonification (solution), stent	Po sonifikacji (rolowanie) After sonification (rolling)
Średnia Average	—	$1,085 \times 10^6$ (SS)	$0,89 \times 10^6$	14
(OS)/(SD)	—	$0,07 \times 10^6$	$0,04 \times 10^6$	(2)

SS (statistically significant) — statystycznie znamienne



Rycina 4. Liczebność bakterii przypadająca na stent w zależności od czasu eksperymentu. Po 12 godzinach od rozpoczęcia eksperymentu nie było statystycznie znamiennej różnicy w liczebności bakterii przy danej prędkości przepływu (test ANOVA, $p < 0,05$)

Figure 4. Number of bacteria on stent depending on the time of experiment. There was no statistically significant difference in the number of bacteria at the given speed of flow after 12 hours since the beginning of the experiment (ANOVA, $p < 0.05$)

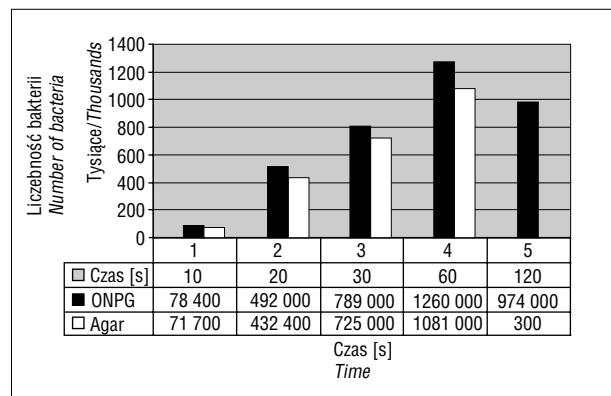


Rycina 5. Liczba bakterii w upuście komory przepływowej w zależności od stężenia inokulum

Figure 5. Number of bacteria in the release of the flow chamber depending on the inoculum concentration

koncentracją bakterii, gdyż biofilm jest strukturą trójwymiarową i rolowanie przenosi na podłoże tylko najbardziej zewnętrzną warstwę bakterii. Rolowanie nie jest także dokładne ze względu na zmienność metaboliczną w kolonii biofilmu. Znaczna liczba bakterii może być w danym momencie żywa, jednak nie dzieli się (*viable but not-culturable phenomenon*), a więc liczba bakterii oceniona metodą agarową jest mniejsza niż w rzeczywistości. Wyniki autorów potwierdziły dane z piśmiennictwa, że rolowanie przenosi tylko 1/4 ogólnej liczby bakterii i dlatego nie powinno być używane do oceny przyczepności bakteryjnej [12].

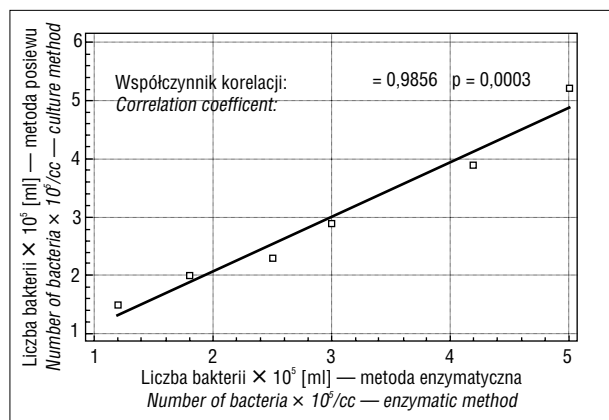
Spośród metod przenoszenia filmu do enumeracji sonifikacja wydawała się autorom najlepszą metodą dla



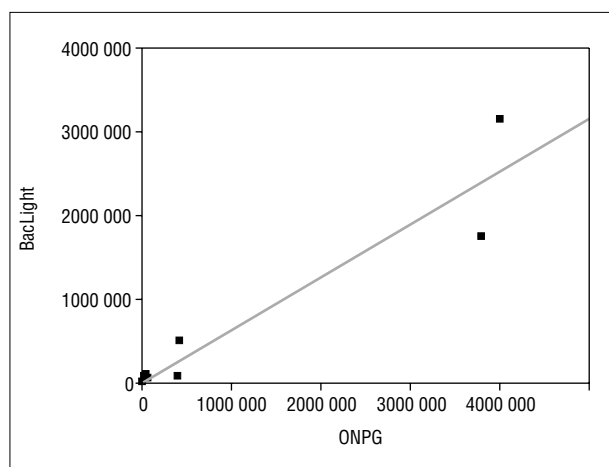
Rycina 6. Liczebność i przeżywalność bakterii podczas sonifikacji

Figure 6. Number and survival rate of the bacteria during sonification

the static model, in which stents are dipped into solution of artificial urine mixed with bacteria [8]. This does not even approximately reconstruct the conditions *in vivo*, since forces of the friction and flow modelling the creation of the biofilm do not exist in it. Therefore, inventing a flow model reconstructing the physiological conditions was one of our priorities. The pulsating pump applied in our model gave a sinusoidal change in the speed of the urine flow similar to the conditions in ureter where wall peristalsis causes from 6 to 12 changes in the speed per minute. The merits of the dynamic model in examining the biofilm are well documented in the literature [9]. Jansen, examining the biofilm in bile ducts, has demonstrated that the results of bacterial adhesion obtained in



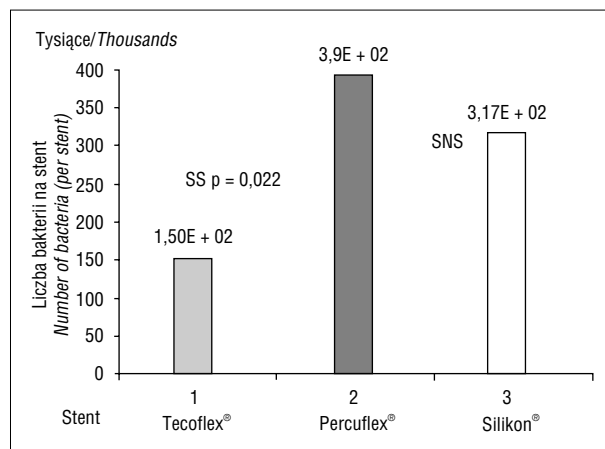
Rycina 7. Porównanie standardowych metod enumeracji bakteryjnej z metodyką opartą na aktywności enzymatycznej β -galaktozydazy dla znanych stężeń bakterii
Figure 7. Comparison of standard methods of bacterial enumeration with methodology based on enzymatic β -galactosidase activity for known concentrations of the bacteria



Rycina 8. Model liniowy liczebności bakterii ocenianej przy użyciu fluorochromów BacLight a metoda enzymatyczna (ONPG) ($p < 0,05$ dla modelu liniowego)
Figure 8. Linear model of the number of bacteria assessed with the use of BacLight fluorochroms and the enzymatic method (ONPG) ($p < 0.05$ for the linear model)

stentów. Sonifikacja była stosowana przez innych autorów i nie wpłynęła w istotny sposób na aktywność enzymatyczną bakterii (aspekt nieoceniany przez autorów niniejszej pracy) [13, 14], a umożliwiła 2–3-krotny wzrost wykrywalności bakterii w materiałach zakażonych (zastawki serca, cewniki dożylnie) [15, 16]. Zastosowano 30-sekundową sonifikację, chociaż większość badaczy wydłużała ją do 2 minut, co w ocenie autorów mogło znacznie zmniejszyć przeżywalność bakterii.

Ponieważ rolowanie okazało się niedokładne i obawiając się, że sonifikacja może do pewnego stopnia zaburzyć integralność błony i ściany komórkowej bakterii oraz zmniejszyć przeżywalność koloni na agarze, autorzy zdecydowali się użyć do enumeracji metod enzyma-



Rycina 9. Porównanie przyczepności pałeczki okrężnicy do badanych stentów. Liczebność oceniona metodą enzymatyczną z użyciem ONPG

Figure 9. Comparison of adhesion of *E. coli* bacteria to examined stents. Number evaluated by the enzymatic method with the use of ONPG

experiments carried out in the dynamic model are significantly different from the static model [10].

In many experiments, biomaterial was rolled on agar and authors counted single bacterial colonies [11]. This method should not be used in the research on biofilm in models with a high concentration of the bacterium because a biofilm is a three-dimensional structure and rolling transfers only the most external layer of the bacterium onto the agar. Rolling is also not accurate because of the metabolic changeability in a colony on the biofilm. A considerable number of the bacteria can be alive, although undivided at that particular moment (a viable but not-culturable phenomenon). Therefore, the number of bacteria assessed with the agar method is lower than the real one. Our results confirmed the data from literature that the rolling transfers only one fourth of the total number of the bacteria and therefore should not be used in the assessment of bacterial adhesion [12].

Out of all the methods of transferring the film for enumeration, sonification seemed for us the best method for stents. Sonification has been used by other authors and it did not significantly influence the enzymatic activity of the bacterium (an aspect not assessed by us) [13, 14], and enabled a 2–3 times higher detectability of the bacterium in infected materials (cardiac valves, intravenous catheters) [15, 16]. We applied 30 second sonification, while the majority of authors lengthened it at least up to 2 minutes which could in our opinion significantly decrease the survival rate of the bacteria.

Since rolling appeared not to be precise and we were afraid that sonification could upset the integrity of the membrane and cell wall of the bacterium and decrease the colonys' survival on agar, we decided to use enzymatic methods for enumeration. The literature data seemed to confirm that short sonification will not influence the activity of examined enzymes and that

tycznych. Dane z piśmiennictwa wydawały się potwierdzać, że krótki czas sonifikacji nie wpłynie na aktywność badanych enzymów oraz że β -galaktozydaza jest stosunkowo oporna na uaktywnienie [17]. Zastosowano metodę permeabilizacji (otwarcie porów) przy użyciu SDS, dzięki czemu autorzy mieli duże szanse na pomiar wielkości objętości enzymu, a co za tym idzie — ocenę liczby bakterii w biofilmie. Pomiar aktywności β -galaktozydazy przy użyciu ONPG jako metodę enumeracji autorzy wybrali ze względu na doskonale opracowaną technologię pomiaru, stabilność enzymu i niski koszt reakcji opartych na ONPG [18]. W niniejszej pracy autorzy wykazali, że pomiar aktywności β -galaktozydazy oparty na ONPG i spektrofotometrii pozwala na dokładne i powtarzalne liczenie bakterii w biofilmie. Dodatkowe użycie metod fluorescencyjnych opartych na przyczepności fluorochromu do DNA, która jest zwykle niezależna od stanu metabolicznego bakterii, umożliwiła naniesienie poprawek na wyniki uzyskane na podstawie metod enzymatycznych [19].

W opisywanych doświadczeniach używano moczu od zdrowych osobników. Wyniki przyczepności bakteryjnej uzyskane w doświadczeniach z moczem ludzkim różnią się diametralnie od wyników badań przeprowadzonych z użyciem moczu sztucznego, który nie posiada wielu składników organicznych znajdujących się w moczu ludzkim [9]. W początkowej fazie doświadczeń autorzy podawali mocz wyjąłowieniu poprzez przepuszczenie przez filtr 0,22 μm . Filtracja 500 cm^3 moczu (nawet z podciśnieniem) trwała 20–26 godzin, ale tak przefiltrowany mocz nie podtrzymywał wzrostu bakterii na stentach nawet z dodatkiem 5-procentowej laktozy (dane nieprzedstawione). Fakt ten potwierdza, jak ważna dla przyczepności bakterii jest obecność białek w płynie tkankowym.

Stężenie bakterii w inokulacie określono empirycznie i okazało się, że tylko stężenie równe 4×10^8 zapewniało stałą koncentrację bakterii przez 24 godziny trwania eksperymentu. Można przypuszczać, że bardzo wysokie stężenie bakterii powoduje masywny przyrost biomasy, a co za tym idzie, obniżenie stężenia materiałów organicznych i przyrost produktów przemiany materii, co może ograniczać wzrost kolonii i przyczynia się do powolnego spadku liczebności bakterii w odpływie. Z kolei niska koncentracja bakterii w inokulacie może powodować ich „wymywanie” z komory przepływowej, uniemożliwiając interakcję między bakteriami i materiałem, co może powodować zaniżoną ocenę dynamiki tworzenia biofilmu. Dostępne modele matematyczne dynamicznych układów biofilmu potwierdzają hipotezę autorów. Co ciekawe, inni badacze używali podobnej koncentracji bakterii w inokulacie (od 10^6 do 10^8) [9, 20]. Czas trwania eksperymentu wynikał z faktu, iż po około 16 godzinach biofilm osiągał równowagę dynamiczną. Równowaga ta jest zmienna dla każdego układu eksperymentalnego i zależy od prędkości przepływu, pH roztworu, a przede wszystkim od bakterii. Wyniki autorów prezentowanej pracy są zbliżone do wyników innych badaczy [21, 22]. Reid i wsp. także zauważyli, że biofilm powstaje w żywym organizmie w ciągu 24 godzin [23].

W swojej pracy autorzy opracowali metodykę badania biofilmu w dynamicznym układzie przepływowym,

β -galaktozydase is relatively resistant to activation [17]. We used the permeabilization method (the opening of leaks) using SDS, thanks to which we had a chance to measure the majority of the volume of the enzyme and to assess the number of bacteria on the biofilm. We chose measurement of β -galaktozydase activity using ONPG as the method of enumeration due to its perfectly well worked out technology, the stability of the enzyme and the low cost of reactions based on ONPG [18]. We have demonstrated in this paper, that measurement the β -galaktozydase activity based on ONPG and spectrophotometry permits accurate and repeatable enumeration of the bacterium on the biofilm. Additional use of the fluorescent methods based on the adhesion of fluorochrome to DNA which is usually independent of the metabolic state of the bacterium, enabled one to correct the results obtained on the base of enzymatic methods [19].

In our experiments we used the urine of healthy individuals. The results of bacterial adhesion obtained in research on human urine are completely different from the findings of the research done with artificial urine, which does not contain many organic ingredients of human urine [9]. In the initial phase of the experiment we sterilized urine by pouring it through a 0.22 μm filter. Not only did the filtration of 500 cc of urine (even under pressure) last for 20–26 hours, but filtered urine did not maintain the growth of the bacteria on stents even with the addition of 5% lactose (not shown in data). This fact confirms how important is presence of proteins in tissue liquid for the adhesion of bacterium.

The concentration of the bacteria in the inoculate was determined empirically and it turned out that only a 4×10^8 concentration ensured a constant concentration of the bacterium for a 24-hour experiment. It is possible that a very high concentration of the bacterium causes the massive growth of biomass and consequently a decrease in the organic materials concentration and increase in metabolic products which can limit the colonies' growth and causes the slow decrease in the number of bacteria in the outflow. On the other hand, a low concentration of bacteria in the inoculate can cause their flushing from the flow chamber, making the interaction between the bacterium and the material impossible which can cause an underestimated assessment of the dynamics of the biofilm's creation. The available mathematical models of dynamic biofilm systems confirm our hypothesis. It is interesting that other researchers have used a similar concentration of bacteria in the inoculate, *i.e.* from 10^6 to 10^8 [9, 20]. The duration of experiment resulted from the fact that the biofilm achieved the dynamic balance after approximately 16 hours. This balance is changeable for every experimental system and depends on the flow speed, on the solution's pH, but first of all on the bacterium. Our results are similar to the results of other authors [21, 22]. Reid also noticed that the biofilm was created in the living organism within 24 hours [23].

In our study we worked out the methodology of examining the biofilm in the dynamic flow system, trying to avoid mistakes and problems of other authors. Taking

starając się uniknąć błędów i trudności innych autorów badających biofilm. Uwzględnienie teoretycznych i doświadczalnych podstaw tworzenia biofilmu i interakcji biomateriałów z mikroorganizmami umożliwiło wypracowanie szybkiej i powtarzalnej metodyki. Pozwoli to autorom, a także innym badaczom kontynuować badania nad właściwościami biomateriałów, których modyfikacja umożliwi w przyszłości stworzenie biomateriałów z minimalną podatnością na powikłania zakaźne. Przedstawiony model ma także zastosowanie w badaniach farmakokinetycznych stentów impregnowanych czynnikami przeciwnowotworowymi, które mogłyby zostać użyte do leczenia nowotworów układu moczowego.

Jednym z najistotniejszych problemów, jakie stoją przed niezależnym (niefinansowanym przez producenta) laboratorium badawczym, jest fakt, że materiały, z których robione są stenty, a także modyfikacja ich powierzchni są chronione prawami patentowymi i większość producentów, nie podaje dokładnych informacji o ich składzie chemicznym. Stanowi to poważną przeszkodę w postępie badań nad biofilmem. Na podstawie wyników prezentowanych badań można stwierdzić, że stent modyfikowany Tecoflex[®] charakteryzuje się najmniejszą podatnością na przyrośnięcie bakteryjne. Inni autorzy wykazali wcześniej, że do modyfikowanych stentów poliuretanowych (z grupami fosforowymi), a także do stentów z polichlorku winylu przyczepia się mniej bakterii niż do stentów silikonowych [24]. Stenty z poliuretanu są także oporniejsze na mineralizację w porównaniu ze stentami z materiału Percuflex[®] [25]. Ponieważ stent Percuflex[®] jest chroniony patentem i producent odmówił dostarczenia informacji na temat jego składu, trudno jest odpowiedzieć na pytanie, dlaczego cechowała go najwyższa przyrośnięcie bakteryjne. Być może spowodowane to było zwiększoną podatnością na mineralizację powierzchni zarówno stentu Percuflex[®], jak i stentu z poliuretanu z pokrywą heparynową. Tunney i wsp. wykazali, że silikon i czysty poliuretan charakteryzują się mniejszą podatnością na mineralizację niż Percuflex[®] [26]. Przegląd literatury medycznej uwzględniający nie tylko właściwości mikrobiologiczne, ale także mechaniczne i biokompatybilność, wydaje się potwierdzać, iż silikon i poliuretan cechuje najniższa podatność na powikłania.

W chwili obecnej nie można odpowiedzieć na pytanie, które z właściwości stentu Tecoflex[®] są odpowiedzialne za powyższe wyniki doświadczalne, jak również nie jest znane ich znaczenie kliniczne i tylko prospektywne badania kliniczne stentów mogą te wyniki potwierdzić. Wydaje się jednak, że wyniki przedstawionych badań wskazują jednoznacznie, że stentu Tecoflex[®] powinno się używać tam, gdzie chce się osiągnąć najniższe możliwe ryzyko powikłań zakaźnych.

Wnioski

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że:

- masa biofilmu osiąga stan dynamicznej równowagi po około 8–16 godzinach eksperymentu przy stałej średniej prędkości przepływu (statycznych siłach tarcia);

into consideration the theoretical and experimental bases of creating a biofilm and the interactions between biomaterials and microorganisms, made it possible to develop fast and repeatable methodology. It will allow us, as well as other researchers, to continue studies on the properties of biomaterials whose modification enables us in the future creation of biomaterials with minimal susceptibility to contagious complications. Our model can also be applied in pharmacokinetic examinations of stents impregnated with antineoplastic factors which could be used to treat cancer of the urinary tract.

One of most essential problems faced by independent (not financed by producers) research laboratory is fact that the materials which stents were made of, as well as any modification of their surface are protected by the patent laws and majority of producers do not give accurate information on their chemical composition. It creates a serious obstacle to progress in researching biofilms. The results of our examinations have shown that the modified stent Tecoflex[®] has the lowest susceptibility to bacterial adhesion. Other authors have demonstrated previously, that modified polyurethane stents (with phosphoric groups), as well as stents of vinyl polychloride attach less bacterium than silicone stents [24]. The polyurethane stents are also more resistant to mineralization in comparison with stents made of the Percuflex[®] material [25]. Since the Percuflex[®] stent is patent-protected and the producer refused to provide information about its composition, we could not answer the question why it was characterised by the highest bacterial adhesion. Perhaps it was caused by the increased susceptibility to the mineralization of the surface of both the Percuflex[®] stent and the polyurethane stent with a heparinized outer layer. Tunney has demonstrated, that both silicone and clean polyurethane are characterised by a lower susceptibility to mineralization than Percuflex[®] [26]. A review of the literature, taking into consideration not only microbiological but also mechanical properties as well as biocompatibility, seems to confirm that silicone and polyurethane have the lowest susceptibility to complications.

We are not able to answer the question as to which of the Tecoflex[®] properties are responsible for above-obtained experimental results. As well as this, their clinical importance is not known at the present moment and only further clinical examinations could confirm these results. However, it seems that our findings clearly show that the Tecoflex[®] stent should be used where the lowest possible risk of contagious complications is required.

Conclusions

It has been confirmed on the basis of the above-performed experiments that:

- the mass of the biofilm achieves a state of the dynamic balance after approx. 8–16 hours duration of the experiment with a constant average speed of the flow (constant friction forces);

- stężenie 4×10^8 bakterii/ml było optymalnym stężeniem tworzącym stałe warunki przy wyjściu z komory przepływowej przy stałej prędkości przepływu; czysty moczek (filtrowany przez filtr $0,2 \mu\text{m}$) nie zapewniał stałych warunków do podtrzymania podziałów bakteryjnych w temperaturze pokojowej, podczas gdy moczek z dodatkiem sterylnego LB medium pozwalał utrzymać stan dynamicznej równowagi w komorze;
- sonifikacja dłuższa niż 60 s powodowała spadek aktywności β -galaktozydazy oraz brak jakiegokolwiek wzrostu na podłożu agarowym (śmierć komórek bakterii);
- rolowanie stentów z biofilmem na agarze powodowało zlewanie się kolonii ze sobą, co uniemożliwiało ich liczenie. Zauważono także, że po jednorazowym rolowaniu stentu na agarze znaczna ilość biofilmu i bakterii pozostawała przyczepiona na stencie;
- sonifikacja stentów umożliwiła przeniesienie biofilmu ze stentu do roztworu z zachowaniem żywotności bakterii;
- metody enzymatyczne są bardzo dokładnym, powtarzalnym i stosunkowo tanim sposobem oceny liczebności bakterii w badanych biofilmie;
- dodanie barwników fluorescencyjnych pozwoliło na ocenę stanu metabolicznego biofilmu (przeżywalność), a także dokładną enumerację bakteryjną;
- spośród trzech badanych stentów stent Tecoflex[®] cechował się prawie 3-krotnie mniejszą przyczepnością bakteryjną, natomiast stent Percuflex[®] miał najwyższą liczbę bakterii w biofilmie na jednostkę długości stentu.

- a concentration 4×10^8 bacterium/ml was the optimum concentration creating constant conditions at the flow chamber entrance with a constant speed of the flow. Clean urine (filtered with a $0.2 \mu\text{m}$ filter) did not assure constant conditions to support bacterial division at room temperature, while urine with the addition of a sterile LB medium allowed one to keep a state of dynamic balance in the chamber;
- sonification above 60 seconds caused a decrease in β -galactosidase activity and the complete lack of growth on the agar base (death of the bacterium cells);
- the rolling of stents with the biofilm on agar caused the colonies to merge with each other which made impossible to count them. It was also noticed, that after a single rolling of the stent on the agar, a considerable amount of the biofilm and the bacterium stayed attached to the stent;
- sonification of the stents enabled one to carry the biofilm from the stent to the solution while keeping the vitality of the bacterium;
- the enzymatic methods are very accurate, repeatable and a relatively cheap way to assess the number of bacteria in the examined biofilm;
- the adding of fluorescent dyes allowed one to assess the metabolic state of the biofilm (survival), as well as accurate bacterial enumeration;
- out of the three stents examined, the Tecoflex[®] stent was characterized by three times lower bacterial adhesion, while the Percuflex[®] stent had the highest number of bacteria in the biofilm on per length of unit of the stent.

Piśmiennictwo (References)

1. Dibdin GH. Mathematical modeling of biofilms. *Adv Dent Res.* 1997; 11: 127–132.
2. Kuhn DM, Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. *Infect Immun.* 2002; 70: 878–888.
3. Picioreanu C, van Loosdrecht MC, Heijnen JJ. Two-dimensional model of biofilm detachment caused by internal stress from liquid flow. *Biotechnol Bioeng.* 2001; 72: 205–218.
4. Burr RG, Nuseibeh IM. Urinary catheter blockage depends on urine pH, calcium and rate of flow. *Spinal Cord.* 1997; 35: 521–525.
5. Morris NS, Stickler DJ, Winters C. Which indwelling urethral catheters resist encrustation by *Proteus mirabilis* biofilms? *Br J Urol.* 1997; 80: 58–63.
6. Denstedt JD, Wollin TA, Reid G. Biomaterials used in urology: current issues of biocompatibility, infection, and encrustation. *J Endourol.* 1998; 12: 493–500.
7. Liedl B. Catheter-associated urinary tract infections. *Curr Opin Urol.* 2001; 11: 75–79.
8. Denstedt JD, Reid G, Sofer M. Advances in ureteral stent technology. *World J Urol.* 2000; 18: 237–242.
9. Goto T, Nakame Y, Nishida M, Ohu Y. Bacterial biofilms and catheters in experimental urinary tract infection. *Int J Antimicrob Agents.* 1999; 11: 227–231.
10. Jansen B, Goodman LP, Ruiten D. Bacterial adherence to hydrophilic polymer-coated polyurethane stents. *Gastrointest Endosc.* 1993; 39: 670–673.
11. Farber BF, Wolff AG. Salicylic acid prevents the adherence of bacteria and yeast to silastic catheters. *J Biomed Mater Res.* 1993; 27: 599–602.
12. Crump JA, Collignon PJ. Intravascular catheter-associated infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2000; 19: 1–8.
13. Ozbek B, Ulgen KO. The stability of enzymes after sonication. 2000; 35: 1037–1043.
14. Rioufol C, Devys C, Meunier G, Perraud M, Goulet D. Quantitative determination of endotoxins released by bacterial biofilms. *J Hosp Infect.* 1999; 43: 203–209.
15. Oulahal-Lagsir N, Marial-Gros A, Bonneau M, Blum LJ. Ultrasonic methodology coupled to ATP bioluminescence for the non-invasive detection of fouling in food processing equipment-validation and application to a dairy factory. *J Appl Microbiol.* 2000; 89: 433–441.
16. Tunney MM, Patrick S, Curran MD *et al.* Detection of prosthetic hip infection at revision arthroplasty by immunofluorescence microscopy and PCR amplification of the bacterial 16S rRNA gene. *J Clin Microbiol.* 1999; 37: 3281–3290.
17. Martini MC, Bollweg GL, Levitt MD, Savaiano DA. Lactose digestion by yogurt beta-galactosidase: influence of pH and microbial cell integrity. *Am J Clin Nutr.* 1987; 45: 432–436.
18. Tryland I, Fiksdal L. Enzyme characteristics of beta-D-galactosidase- and beta-D-glucuronidase-positive bacteria and their interference in rapid methods for detection of waterborne coliforms and *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* 1998; 64: 1018–1023.

19. Heydorn A, Ersbøll BK, Hentzer M, Parsek MR, Givskov M, Molin S. Experimental reproducibility in flow-chamber biofilms. *Microbiology* 2000; 146: 2409–2415.
20. Jackson G, Beyenal H, Rees WM, Lewandowski Z. Growing reproducible biofilms with respect to structure and viable cell counts. *J Microbiol Methods*. 2001; 47: 1–10.
21. Khaled GH, Finkelstein FO, Carey HB *et al.* Method for studying development of colonization and infection of dialysis catheters. *Adv Perit Dial*. 2001; 17: 163–171.
22. Gilsdorf JR, Wilson K, Beals TF. Bacterial colonization of intravenous catheter materials in vitro and in vivo. *Surgery* 1989; 106: 37–44.
23. Reid G, Denstedt JD, Kang YS *et al.* Microbial adhesion and biofilm formation on ureteral stents in vitro and in vivo. *J Urol*. 1992; 148: 1592–1594.
24. Belanger MC, Marois Y, Roy R *et al.* Selection of a polyurethane membrane for the manufacture of ventricles for a totally implantable artificial heart: blood compatibility and biocompatibility studies. *Artif Organs*. 2000; 24: 879–888.
25. Lammer J, Stoeffler G, Petek WW *et al.* In vitro long-term perfusion of different materials for biliary endoprostheses. *Invest Radiol*. 1986; 21: 329–331.
26. Tunney MM, Keane PF, Jones DS, Gorman SP. Comparative assessment of ureteral stent biomaterial encrustation. *Biomaterials* 1996; 17: 1541–1546.

Adres do korespondencji (Address for correspondence):

Prof. dr hab. med. Jerzy Niedzielski
Oddział Kliniczny Chirurgii i Urologii Dziecięcej
ul. Sporna 36/50
91–738 Łódź
e-mail: jniedzielski@surgey.pl

Praca wpłynęła do Redakcji: 10.09.2005 r.