

# Biomateriaalien bakteeridheesion vastustuskyky: tantaali, titaani ja kromi verrattuna timantinkaltaiseen hiileen

*Jaakko Levon, Katja Myllymaa, Vesa-Petteri Kouri, Riina Rautemaa, Teemu Kinnari, Sami Myllymaa, Yrjö T. Konttinen, Reijo Lappalainen*

*Sisätaudit, Kliininen laitos  
Helsingin yliopistollinen keskussairaala  
Invalidisäätien ortopedinen sairaala ORTON, Helsinki  
Tekonivelsairaala COXA, Tampere  
Fysiikan laitos, Kuopion yliopisto*

We compared diamond-like carbon (DLC) to commonly used metallic biomaterials with regards to *Staphylococcus aureus* adhesion. Patterned silicon discs with circles of tantalum, titanium, chromium and DLC were produced using ultraviolet lithography and plasma vapor deposition. Discs were exposed to *S. aureus* (S-15981) for 90 minutes and stained with acridine orange. Adhesion index showed that the ranking order was titanium, tantalum, chromium and DLC, with the DLC being clearly most resistant against colonization with *S. aureus* in the presence of serum. Furthermore, micro-patterned surfaces are useful for quantitation of bacterial adherence on different biomaterials.

## *Johdanto*

Korkealaatuisten nivelproteesien tarve kasvaa paremman elämän laadun tavoittelun ja artriittipotilaiden määrän lisääntyessä. Siksi myös implantti-infektiot ovat yleisempiä kuin koskaan ennen. Erityisesti immuniteetiltaan heikentyneillä kemoterapia- ja elinsiirtopotilailla tämä infektion riski on suuri.(1,2) Niille, jotka infektion saavat ja myös yhteiskunnalle tämä on vaikea komplikaatio joka aiheuttaa kärsimystä, kuolevuutta ja lisää terveydenhuoltokuluja.(3,4) Yhdysvalloissa jo puoli miljoonaa kahdesta miljoonasta vuositaisesta sairaalalähtöisistä infektioista on implantteihin liittyviä.(4)

Tantaali, titaani ja kromi ovat laajasti käytettyjä biomateriaaleja ortopedisissä implanteissa. Niillä on hyvä kulutuskestävyys, kudossyhteensopivuus ja vastustuskyky elektrokemialliselle korroosiolle. Huokoisetkaan tantaalirakenteet eivät aiheuta ärsytystä, ovat korroosiokestäviä ja sitoutuvat hyvin luuhun.(5,6) Haittapuolena tällaisessa yhteensopivuudessa voi olla

se, että tantaali- ja titaanipinnat myös tarjoavat hyvän alustan mikrobien adheesiolle, kasvulle ja biofilmin muodostukselle.(7,8) Biofilmissä bakteerit viettävät vita minimaa eivätkä ole yhtä herkkiä antibiooteille kuin planktoniset bakteerit ja ovat samalla suojassa antibiooteilta ja elimistön puolustusreaktioilta, jotka eivät pysty kunnolla tunkeutumaan bakteerilimaan.(9,10) Näitä metalleja verrattiin timantinkaltaiseen hiileen (diamond-like carbon,DLC).(11-14) Noin kahdessa kolmasosassa kaikista implantti-infektioista on aiheuttajana *Stafylococcus aureus* tai *Stafylococcus epidermidis* eli koagulaasi-negatiivinen stafylokokki.(4,15) Tästä syystä käytimme *S. aureus*ta kokeisamme. Hypoteesina oli, että yllämainituilla testauskierroilla on mahdollista verrata konventionaalisten ja uusien biomateriaalien kykyä vastustaa mikrobien tarttumista niiden pintaan ja että timantinkaltainen DLC hiilipinnoitus voisi suojata implantti infektioilta.

## Menetelmät

### Maskien valmistus

Mikrokuviolliset pinnat valmistettiin 5" <100> piioksidikiekoille (Okmetic Ltd, Vantaa, Finland) käyttämällä ultraviolettilitografiaa ja fysikaalisia kaasufaasipinnoitus menetelmiä. Maskit suunniteltiin CleWin layout ohjelmalla (WieWeb software, Hengelo, The Netherlands) ja valmistettiin käyttämällä laser-skannaus tekniikkaa (Mikcell Oy, <http://www.mikcell.com/mask.htm>, Ii, Finland) 4 tuuman kromipinnoitetuille lasilevyille. Yhden kuvioitun näytelevyn koko oli 10 mm x 10 mm ja se sisälsi neljä 4 mm x 4 mm aluetta. Yksi niistä oli puhdas referenssipinta ilman kuviointia. Kolme muuta oli kuvioitu 5, 25 ja 125 µm (d) ympyröin. Näytteet valmistettiin sekä positiivina että negatiivina: a) biomateriaali ympyröitä piioksiditaustalla ja b) sen negatiivina: piioksidiympyröitä biomateriaalitaustalla.

### Ultraviolettilitografia

Hyvä tarttuminen piioksidikiekkotaustamateriaalin ja valoresistin välille saatiin esikäsittelemällä kiekot 20 % heksametyylisilatsaanilla (HMDS, Semiconductor Grade Puranal, Riedel-de Haen Laborchemikalien GmbH, Seelze, Germany) ksyleenissä. Epoksipohjainen negatiivinen valoresisti SU-8 2003 (MicroChem, Newton, MA) pyörityspinnoitettiin kiekolle ja lämpökäsiteltiin. Jäähdytymisen jälkeen SU-8 kerros altistettiin 365 nm UV-valolle (Karl Suss MA45, Suss Microtec Inc., Waterbury Center, VT, USA) maskin läpi. Valotumattomat SU-8 alueet liuotettiin propyleeniglykoli metyylietteriasetaattiin (PGMEA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), jolloin lopullinen resistikuvio muodostui. Näytteet puhdistettiin isopropanolilla ja ionisuo datetulla vedellä käyttäen ultraääntä. (16,17).

### Kaasufaasipinnoitukset

Pintojen puhdistus tyhjiössä tehtiin argon ionisuihkulla. Tantaali-, titaani- ja kromipinnoitteet valmistettiin käyttäen tasavirta sputterointitekniikkaa (AJA International Stiletto Serie ST20). Varsinaisessa pinnoituksessa kaasunpaine säädettiin 3-4 x 10<sup>-4</sup> millibaariin ja jännite 400-500 volttiin. 200 nm paksuisen pinnoitteen tuottaminen kesti noin 15 minuuttia. DLC-pinnoitteiden valmistukseen käytetty hiiliplasmapulssi saadaan aikaan sytyttämällä katodilla tyhjiö-

kaari, joka luo oikosolun katodin ja anodin välille ja purkaa kondensaattorin. Pulssien taajuus on 1-7 Hz. Korkeaenerginen plasma kiihdytettiin käyttämällä 6000 V jännitettä ja 16.0 µF kondensaattoria. Plasma ohjattiin kohteeseensa solenoidien avulla 90 ° kaartaamalla magneettikentällä, joka siivilöi neutraalit atomit ja grafiittipartikkelit plasmapiilvestä. Adheesiokerroksen luomisen jälkeen pääosa 200 nm paksuisesta pinnoitteesta tuotettiin matalaenergisellä 500 V yksiköllä 15 minuutissa. Pinnoittamisen jälkeen kiekot puhdistettiin asetonissa tai resistin poistajassa (mr-Rem 660, micro resist technology GmbH, Berlin, Germany). Maskin päälle jäänyt pinnoite poistettiin maskin kanssa. Suuret piikiekot pilkottiin yksittäisiksi näytteiksi tarkoitusta varten rakennetulla laitteella, jossa käytetään timanttiveistä.

### Biomateriaalinäytteiden esikäsitteleminen

Biomateriaalinäytteet käsiteltiin vasikan sikiön seerumilla 15 minuuttia +37 °C:ssa ja pestiin 3 x 5 min fysiologisessa fosfaattipuskurissa.

### Sterilisaatio

Näytteet puhdistettiin etanolipyyhkeillä ja huuhdeltiin 70 % etanolilla. Ne pakattiin lämpösuljettuihin muovipusseihin ja gammasteriloitiin 28 kGy:llä.

### Staphylococcus aureus -viljelmät

Tri Lasan eristämään ja kuvaamaan S-15981 S. aureus(18) viljeltiin veri-agar maljoilla. Kaksikymmentä bakteeripesäkettä (kolonia) liuotettiin 10 ml:aan Tryptic Soy broth (TBS)-elatusainetta ja viljeltiin 24 tuntia +37 °C:ssa. Sitten vielä 1 ml bakteeriliuosta laimennettiin 9 ml:aan TSB-elatusainetta ja viljeltiin 18 tuntia, jonka jälkeen bakteerit laimennettiin fysiologiseen keittosuolaan 5 x 10<sup>8</sup> kolonia/ml pitoisuuteen käyttäen McFarland-standardia(19) ja verimaljoilla viljeltyä laimennussarjaa (Trypticase soy agar ja Mueller Hinton agar 5 %:ssa hevosen veressä). Bakteeriliuos pipetoitiin triplikaatteina testikiekoille, joita inkuboitiin 90 min +37°C:ssa. Ennen analyysiä testikiekot pestiin 3 kertaa tislatussa vedessä.

### Akridiinioranssivärjäys

Näytteitä inkuboitiin 2 min 0.2 M asetaattipuskuriin, pH 3.8, 1:10000 (w/v) laimennetussa akridiiniorans-

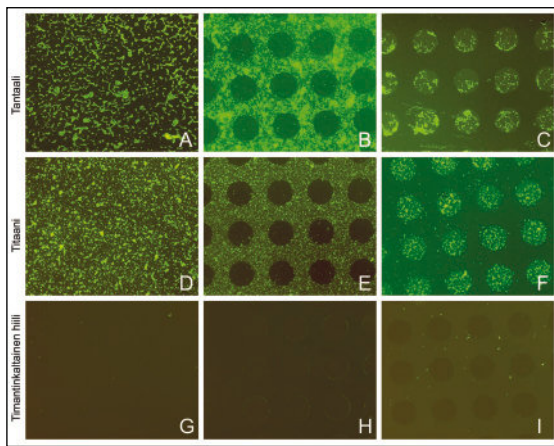
si 3R -värissä. Akridiinioranssi 3R läpäisee bakteerin solukalvon ja sitoutuu elektrostaattisesti DNA:han ja RNA:han. Värjäyksen jälkeen näytteet huuhdeltiin vedellä.

## Mikroskopia

Akridiinioranssi värjättyjä näytteitä tarkasteltiin epifluoresenssimikroskoopilla käyttäen 460-495 nm eksitaatiota ja 510 nm emissiota. Valokuvat otettiin mikroskoopiin kytketyllä PCO Sencam digitaalikameralla.

## Bakteeriadheesion kvantitaatio

Bakteerien kiinnittyminen biomateriaalin pintaan laskeettiin Adobe Photoshop CS2 -ohjelman avulla tuotetuista neljästä 91 µm (d) ympyrästä. Kuva-analysaattorin avulla tausta määritettiin mustaksi, jonka jälkeen kuvat avattiin ja analysoitiin Image J 1.37c-ohjelmalla käyttäen WCIF plug-in-toiminnon nucleus-counter-laskuria. (20,21)



Kuva 1. *Staphylococcus aureus* S-15981 kannan adheesio erilaisille yhtenäisille ja mikroteksturoiduille materiaaleille. Ylin rivi näyttää adheesion tantaaliin, keskimäinen titaaniin ja alimmainen timantinkaltaiseen hiileen (DLC). Ensimmäisellä palstalla on yhtenäiset pinnat, toisella 125 µm piioksidipyörät biomateriaalitaustalla (negatiivinen kolmannen sarakkeen pintoihin nähden) ja kolmannella samankokoiset biomateriaalipyörät piioksiditaustalla. Akridiinioranssivärjäys, alkuperäinen suurennos x 10.

## Tulokset

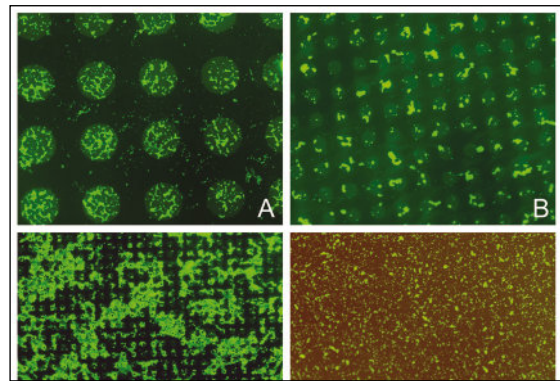
### Yhtenäiset pinnat ilman kuviointia

Tantaali- (Kuva 1, paneeli A) ja titaani-pinnoitteet (Kuva 1, paneeli D) olivat hyviä kiinnittymisalustoja *S. aureus* bakteereille, mutta bakteerit eivät ollenkaan yhtä hyvin pystyneet tarttumaan kromi- tai DLC-pinnoitteisiin (Kuva 1, paneeli G).

### Kuvioidut pinnat

*S. aureus* bakteerit tarttuivat kuvioille, jotka ohjasivat niiden adheesiota. Ne kasvoivat lähes yksinomaan tantaali- (Kuva 1, paneeli C) ja titaaniympyröillä (Kuva 1, paneeli F) piioksiditaustan jäädessä bakteerivapaaksi. Sen sijaan ne tarttuivat hyvin huonosti DLC-pinnoitetuille ympyräkuvioille (Kuva 1, paneeli I; kromi antoi samanlaiset tulokset).

Mikäli ympyrä- ja taustamateriaalit oli tuotettu negatiiviksi niin että tantaali (Kuva 1, paneeli B) ja titaani (Kuva 1, paneeli E) muodostivat taustan ja piioksidi ympyrät, *S. aureus* suosi tantaali- ja titaani-taustaa. Myös tässä tutkimusasetelmassa DLC vastusti bakteerien adheesiota (Kuva 1, paneeli H) niin, että tutkitut biomateriaalit voitiin laittaa selkeään ranking järjestykseen (Taulukko 1).



Kuva 2. *Staphylococcus aureus* S-15981 kannan adheesio erikokoisille mikroteksturoiduille titaanikuviolle. Jokaisella näytteellä oli neljä erilaista pinta-aluetta. Alueet muodostuivat 125 µm (paneeli A, alkuperäinen suurennos x 10), 25 µm (paneeli B, alkuperäinen suurennos x 20) ja 5 µm (paneeli C, alkuperäinen suurennos x 40) halkaisijaltaan olevista mikroteksturoidusta ympyröistä, joita verrattiin yhtenäiseen referenssipintaan (paneeli D). Akridiinioranssivärjäys.

**Taulukko 1. *Stafylococcus aureus* S-15981 kannan adheesio mitattuna neljästä eri biomateriaalista valmistettuihin 125 µm halkaisijan ympyröihin piioksiditaustalla, joka toimii sisäisenä standardina (taustana). Adheroituneiden bakteerien peittämä pinta-ala esitetään prosentteina koko pinta-alasta. Neljäs sarake näyttää adheesio-*vastustusindeksin* piitaustaa vasten testatuille biomateriaaleille: timantinkaltaisella hiilellä on ylivoimainen bakteerien kiinnittymistä vastustava kyky.**

Materiaali	Kiinnittyminen ympyröihin*	Kiinnittyminen taustalle*	Biomateriaali : Tausta Indeksi
Titaani	24.65 %	0.72 %	34.24
Tantaali	14.76 %	0.79 %	18.68
Kromi	1.42 %	0.68 %	2.09
DLC	0.48 %	0.53 %	0.91

\*Prosentuaalinen osuus alasta, jonka kiinnittyneet bakteerit peittävät.

### Erikokoisten kuvioiden vertailu

Jokainen näytelevy sisälsi neljä erilaista aluetta, joista kolmella oli halkaisijaltaan erikokoisia 125 µm, 25 µm tai 5 µm ympyräkuvioita, joita verrattiin yhtenäiseen materiaalipintaan ilman kuviointia. Pintaan tarttuneiden bakteerien määrä oli kromi- ja DLC-pinnoitteilla niin vähäinen, ettei kuvioiden koon vaikutusta bakteeriadheesioon niillä pystytty tutkimaan. Titaani- ja tantaalipohjaisilla kuviolla nähtiin selvä ohjausvaikutus. Bakteerit tarttuivat suuriin 125 µm ja keskikokoisiin 25 µm kuvioihin, mutta välttivät tarttumasta piioksiditaustaan. Näin bakteerit saatiin tarttumaan tarkasti metallipintaisille ympyröille (Kuva 2, paneeli A ja paneeli B) tai negatiivinäytteissä metallitaustalle. Tutkittaessa pieniä 5 µm ympyröitä todettiin, että bakteerit tarttuivat sekä kuvioihin että taustaan eivätkä niin selkeästi seuranneet metallipäällysteisten alueiden rajoja (Kuva 2, paneeli C). Puhtailla biomateriaalipinnoilla bakteerit muodostivat jokseenkin yhtenäisiä bakteeripeitteitä. Tantaali käyttäytyi tältä osin titaanin tavoin.

### Pohdinta

Fysiologisia proteiini-vapaita puskuriliuoksia käytetään usein bakteeriadheesio- kokeissa, koska plasman proteiinien ajatellaan häiritsevän ”puhdasta” bakteerimateriaali interaktiota. In vivo implantin pinta pinnoittuu kuitenkin aina joidenkin millisekuntien aikana kudostestien tai seerumin proteiineilla.(22,23) Tällaisilla pinnoilla bakteerit tunnistavat ja tarttuvat näihin valkuaisaineisiin. Valkuaisaineiden kiinnittymisprosessissa on hyvin nopea (välitön) vaihe, jota seuraa hitaampi vaihe lähestyttäessä tasapainotilaa.

Suurin osa adsorboituvista proteiineista tarttuu lähes palautumattomasti materiaalin pintaan. Proteiinien kilpaillessa keskenään pitoisuus ja affiniteettierot määräävät lopulta kompetitiivisen adsorption lopputuloksen. Esimerkiksi alhaisen sitoutumisvoiman omaavan albumiinin pitoisuus plasmassa on paljon suurempi kuin fibrinogeenin, ja siksi plasmasta adsorboituneen fibrinogeenin määrä pinnalla on yleensä sama kuin albumiinin. Pinnoille kiinnittyvät proteiinit käyvät myös läpi muodonmuutoksia ja saattavat esimerkiksi oieta tarttuen näin entistä lujemmin pinnalle. Termodynaamisesti labiilit proteiinit aukenevat denaturoivissa olosuhteissa ja kiinnittyvätkin hyvin biomateriaalipinnoille.(24) Koska tutkimuksemme tähtää pinnoitteiden lääketieteelliseen käyttöön, adheesio-koeket tehtiin käyttämällä seerumilla esikäsiteltyjä biomateriaaleja, jotta adheesio-olosuhteet muistuttaisivat ihmisen elimistössä vallitsevia. Liuotettu TSB-elatusaineliuos sisälsi myös proteiineja, joita bakteerit käyttävät ravinnokseen.

Teknologian, elektroniikan ja biomateriaalien kehittyessä erilaisten implanttien ja lääkinnällisten laitteiden käyttö on lisääntynyt<sup>4</sup>. Varjopuoli tässä kiihtyvässä kehityksessä on abioottisten biomateriaalien heikko kyky vastustaa bakteerien pintaan tarttumista, kolonisaatiota ja biofilmin muodostusta. Periaatteessa olisi mahdollista torjua implantti-infektioita tehokkailla nykyaikaisilla antibiooteilla, mutta biofilmi suojaa tehokkaasti bakteereita antibiooteilta. Ekstrasellulaarisessa polymeerimatriksissa ei ole verenkiertoa ja passiivinen diffuusio kudostestistä biofilmin sisään edellyttäisi jopa 500-5000-kertaista antibiootipitoisuutta verrattuna tavallisten pehmytkudosten infektioiden hoidossa käytettäviin määriin.(25) Lisäksi

biofilmissä lepäävät bakteerit eivät ole yhtä herkkiä antibioottivaikutukselle kuin eksponentiaalisesti kasvavat bakteerit. Tavanomaiset antibioottiannokset johtavat implanttipotilailla helposti resistenssiongelmiin. Metisilliini-resistentti stafylokokki ja vankomysiini-resistentti enterokokki ovat jo globaalinen ongelma. Tutkimuksemme perusteella implantti-infektioita voitaisiin myös välttää käyttämällä bakteerien adheesiota ja kolonisaatiota vastustavia materiaaleja ja/tai pinnoitteita. Timantinkaltaisella hiilellä ja puhtaalla kromilla oli ylivoimainen mikrobiadheesion vastustuskyky verrattuna tantaaliin ja titaaniin. Kromi ei sellaisenaan sovellu biomateriaaliksi karsinogeenisten, hapettavien ja ärsytystä aiheuttavien ominaisuuksiensa vuoksi. (26)

Mikrobiologisissa adheesiokokeissa erot eri kokeiden välillä vaikeuttavat tulosten tulkintaa ja eri tutkimusten vertailua. Tätä yritimme välttää kahdella eri tavalla. Tuotimme kuvioita aina samalle taustamateriaalille, joten oli mahdollista normalisoida tulokset eri kokeissa. Lisäksi käytimme yksinkertaista biomateriaali-arraytä, jossa useita 4-osaisia näytelevyjä oli kiinnitetty samalle lasiselle testauskiekolle. Näin bakteerien määrä per testattava materiaali oli täysin sama eri biomateriaalikuviuille.

Biomateriaalin kemian lisäksi (27) työmme viittaa siihen, että myös tartunta-alan koko on tärkeä bakteeriadheesiolle. Yhtenäistä pintaa verrattiin 125 µm, 25 µm ja 5 µm ympyräkuvioiden, jotka kaikki, riippumatta ympyrän halkaisijasta, peittivät yhtä suuren pinta-alan näytteestä (30.6 %). Teimme kolme mielenkiintoista havaintoa. Yhtenäisillä pinnoituksilla tai pinnoituksen peittäessä 70 % näytteen kokonaispinta-alasta (taustan) bakteerit jakautuivat verrattain tasaisesti biomateriaalipinnalle muodostaen pieniä pesäkkeitä. Kun vain 30,6 % pinta-alasta oli bakteerien adheesiota suosivaa biomateriaalia, ne muodostivat pieniä biofilmin suojissa kasvavia bakteeriyhteisöjä jo 90 minuutissa. Jos ympyräkuvioiden halkaisija oli vain 5 µm, bakteerit näyttivät kasvavan myös piioksiditaustalla. Selityksenä saattaisi olla se, että pienet ympyrät ovat hyvin lähellä toisiaan. Stafylokokin halkaisija on noin 1 µm. Tämä tarkoittaa sitä, että jo kolme stafylokokkia rivissä voisivat yhdistää 3 µm etäisyydellä toisistaan olevat kaksi 5 µm läpimittaista ympyrää. Bakteerilima saattaisi näin muodostaa yhdistäviä ”siltoja” biomateriaalisaarekkeiden välille niin, että ympyröiden välissä olevat bakteerit eivät itse asiassa olekaan kontaktissa piioksiditaustan kanssa vaan kasvavat niiden alla olevassa bakteerilimassa.

Tutkimuksen tuloksista ilmenee, että seerumin

läsnä ollessa DLC vastustaa mikrobien kiinnittymistä paremmin kuin perinteiset biomateriaalit. Ainakin siis staattisissa adheesio-olosuhteissa DLC-pinnoitetta voitaisiin käyttää vähentämään implantti-infektioita ja parantamaan sairaala- ja leikkaussalihygieniaa.

#### *Kirjallisuus:*

1. Brown A, Grubbs P, Mongey AB: Infection of total hip prosthesis by *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium chelonae* in a patient with rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol.* 2008;27(4):543-545.
2. Papavasiliou AV, Isaac DL, Marimuthu R, Skyrme A, Armitage A: Infection in knee replacements after previous injection of intra-articular steroid. *J Bone Joint Surg Br.* 2006;88-B(3):321-323.
3. Josefsson G, Kolmert L: Prophylaxis with systematic antibiotics versus gentamicin bone cement in total hip arthroplasty. A ten-year survey of 1,688 hips. *Clin Orthop Relat Res.* 1993;292:210-214.
4. Darouiche RO: Treatment of infections associated with surgical implants. *N Engl J Med.* 2004;350:1422-1429.
5. Kato H, Nakamura T, Nishiguchi S, Matsusue Y, Kobayashi M, Miyazaki T, Kim HM, Kokubo T: Bonding of alkali- and heat-treated tantalum implants to bone. *J Biomed Mater Res.* 2000;53(1):28-35.
6. Levine BR, Sporer S, Poggie RA, Della Valle CJ, Jacobs JJ: Experimental and clinical performance of porous tantalum in orthopaedic surgery. *Biomaterials.* 2006;27:4671-4681.
7. An YH, Friedman RJ: Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces. *J Biomed Mater Res.* 1998;43(3):338-348.
8. Gristina AG: Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration. *Science.* 1987;237(4822):1588-1595.
9. Naylor PT, Myrvik QN, Gristina AG: Antibiotic resistance of biomaterial-adherent coagulase-negative and coagulase positive staphylococci. *Clin Orthop Relat Res.* 1990;261:126-133.
10. Gristina AG, Jennings RA, Naylor PT, Myrvik QN, Webb LX: Comparative in vitro antibiotic resistance of surface-colonizing coagulase-negative staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother.* 1989;33:813-816.
11. Anttila A, Lappalainen R, Tiainen VM, Hakovirta M: Superior attachment of high quality hydrogen-free amorphous diamond films to solid materials. *Advanced Materials.* 1997;9:1161-1164.
12. Tiainen VM: Amorphous carbon as a bio-mechanical coating – mechanical properties and biological applications. *Diamond and Related Materials.* 2001;10:153-160.
13. Lappalainen R, Santavirta S: Potential of coatings in total hip replacements. *Clin Orthop Relat Res.* 2005;430:72-79.
14. Roy RK, Lee K-R: Biomedical applications of diamond-like carbon coatings: A review. *J Biomed Mater Res B: Appl Biomater.* 2007;83(1):72-84.

15. Campoccia D, Montanaro L, Arciola CR: The significance of infection related to orthopaedic devices and issues of antibiotic resistance. *Biomaterials*. 2006;27(11): 2331-2339.
16. Madou M. *Fundamentals of microfabrication*: CRC Press; 1997.
17. Voldman J, Gray ML, Schmidt MA: *Microfabrication in biology and medicine*. Annual review of biomedical engineering 1999;1:401-425.
18. Valle J, Toledo-Arana A, Berasain C, Ghigo JM, Amorena B, Penades JR, Lasa I: SarA and not sigmaB is essential for biofilm development by *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol*. 2003;48:1075-1087.
19. Chapin KC, Lauerdale T. Reagents, Stains, and Media: Bacteriology. In: Murray R, Baron EJ, Jorgensen J, editors: *Manual of Clinical Microbiology* 1. 9th ed. Washington: ASM Press; 2007. p. 334-364.
20. Abramoff MD, Magelhaes PJ, Ram SJ: *Image Processing with ImageJ*. Biophotonics International. 2004;11:36-42.
21. Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 1997-2007.
22. Francois P, Vaudaux P, Lew PD: Role of plasma and extracellular matrix proteins in the physiopathology of foreign body infections. *Ann Vasc Surg*. 1998;12:34-40.
23. Eskin SG, Horbett TA, McIntire LV, Mitchell RN, Ratner BD, Schoen FR, Yee A. Some back concepts. In: Ratner BD, Hoffman AS, Scheen FJ, Lemons JE, editors: *Biomaterials Science. An Introduction to Materials in Medicine*. 2nd ed. Amsterdam: Elsevier Academic Press; 2004. p. 237-246.
24. Horbett TA, Brash JL. Proteins at interfaces: an overview. In: Horbett TA, Brash J, editors: *Proteins at Interfaces 2: Fundamentals and Applications*. ACS Symposium Series 602. Washington D.C.: American Chemical Society; 1995. p.1-25.
25. Anwar H, Dasgupta MK, Costerton JW: Testing the susceptibility of bacteria in biofilms to antibacterial agents. *Antimicrob Agents and Chemother*. 1990;34(11):2043-2046.
26. Barceloux DG: Chromium. *J Toxicol Clin Toxicol*. 1999;37(2):173-194.
27. Missirlis YF, Katsikogianni M: Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteriamaterial interactions. *Eur Cells Mater*. 2004;8:37-57.