

Дезинфекция препаратов головки бедренной кости с использованием Марбургской системы костного банка Lobator (Lobator SD 1)

Ретроспективная оценка контроля качества костного банка ENDO-KUNIK

Май 1998 г.

Ларс Фроммельт (Lars Frommelt), M.D.
Заведующий отделением
Bacterio - Serological Laboratories
(Бактерио-серологические лаборатории)
ENDO-KUNIK
Гамбург, Германия

1 Введение

Марбургская система костного банка Lobator (Lobator SD 1 / Telos Co., Хунген, Германия) в клинике ENDO-KLINIK используется для термической дезинфекции аллогенных трансплантатов головки бедренной кости человека, взятых от живых доноров, с ноября 1994.

Для каждого трансплантата проводился микробиологический анализ, являвшийся одной из процедур внутреннего контроля качества.

Образцы губчатого вещества кости брали одновременно и проводили их бактериологическую оценку.

После завершения процесса термической дезинфекции дезинфицированная жидкость оценивалась на предмет наличия микроорганизмов. Только в случае, когда в обоих исследованиях не обнаруживалось роста бактерий, головку бедренной кости передавали на трансплантацию. Кроме того, результаты серологических исследований костного материала, недавно полученного от доноров, должны быть четко отрицательными в отношении гепатита В (HBs-Ag, Anti-HBc), гепатита С (Anti-HCV), вируса иммунодефицита человека - HIV (Anti HIV 1/2, HIV p24 antigens) и бледной спирохеты (*Treponema pallidum*).

Целью тестирования являлась демонстрация того, что обработка с помощью системы Lobator SD 1 способна эффективно устранить вегетативное бактериальное заражение трансплантатов.

2 Материалы и методы

2.1 Получение и дезинфекция трансплантатов

Трансплантаты были получены при первичных операциях по эндопротезированию тазобедренного сустава, проводившихся в операционной, имеющей обычную систему вентиляции, в соответствии со стандартом DIN 1946 часть 4. Из трансплантата брали образец губчатого вещества кости, имеющий приблизительно 5 мм в диаметре, который затем тестировали в бактерио-серологической лаборатории клиники ENDO-KLINIK на предмет наличия бактерий. В операционной трансплантат переносили в дезинфекционный контейнер (Telos Co., Хунген, Германия). Контейнер был заполнен стерильным лактатным раствором Рингера. Дезинфекционный контейнер переносили в лабораторию, и в специальном месте лаборатории трансплантат обрабатывался в установке Lobator. После окончания процесса термической дезинфекции с использованием стерильного шприца в стерильных условиях брали образец дезинфицированной жидкости. Затем его тестировали на предмет наличия бактерий и грибов в гемокультуральной системе VITAL (bioMerieux Co., Марси-л'Этуаль, Франция). Все этапы бактериологической обработки, на которых имелся риск бактериального заражения, проводились в ламинарном боксе ("класс 100").

2.2 Испытательная лаборатория

Это - специальная микробиологическая лаборатория клиники ENDO-KLINIK, которая главным образом предназначена для диагностики перипротезных инфекций. Эту лабораторию возглавляет врач-консультант, являющийся специалистом по микробиологии и эпидемиологии инфекционных болезней, который регулярно принимает участие в исследованиях, связанных с внешним контролем качества.

2.3 Период проведения исследования

С ноября 1994 г. по 31 декабря 1997 г. всего было протестировано 2458 трансплантатов. Для каждого трансплантата тестировали образец костной ткани, взятый после извлечения трансплантата, и дезинфицированный раствор, полученный после обработки. Трансплантаты, для которых образец кости или жидкости, полученной после дезинфекции, не проходил тестирование, не передавались для трансплантации, т.е. выбрасывались.

2.4 Микробиологические исследования

2.4.1 Первичные культуры

Образец губчатого вещества кости, взятый из трансплантата при проведении операции, инкубировали в течение 14 дней при температуре 35 °C в инкубационной камере в верхнем слое культуральной среды в соответствии с описанием Лоденкампера (Lodenkamper) (1). Эти образцы осматривались и контролировались ежедневно. Культуры приготавливались в стерильных условиях в ламинарном боксе "класса 100". По окончании инкубационного периода микроскопические препараты оценивались после окрашивания по Граму и помещались в поверхностные культуры на Колумбийский кровяной агар (Difco Co., Детройт, США). Если за период наблюдения, при последующем микроскопическом анализе или в поверхностной культуре бактерии или грибы не были обнаружены, то культуру определяли как "не имеющую признаков роста" ("no growth").

Из термически дезинфицированной жидкости брали образец объемом 10 мл, инокулировали в культуральный сосуд для аэробных и анаэробных гемокультур (Hemoline VITAL duo, bioMerieux, Marcy Etoile) и инкубировали в течение 14 дней в гемокультуральной системе Vital. По окончании периода наблюдения или в случае соответствующей индикации прибора аликвоту объемом 5 мл центрифугировали при скорости 3000 об/мин, и после окрашивания по Граму проводили микробиологический анализ. Кроме того, на Колумбийский кровяной агар в аэробных условиях и на Бруцелловый кровяной агар (Difco Co., Детройт, США) помещалась поверхностная культура. Если за период наблюдения и при последующем тестировании микроорганизмы не были обнаружены, то культуру определяли как "не имеющую признаков роста".

2.4.2 Диагностика роста микроорганизмов

При обнаружении роста микроорганизмов использовалась ориентировочная диагностическая схема, которая позволяла исключить наличие *Staphylococcus aureus*, β -гемолизирующих стрептококков, энтерококков, фекальных микроорганизмов и *Pseudomonas aeruginosa*. Для определения дрожжевых грибов была предписана диагностика, которая позволяла исключить наличие *Candida albicans*. Анаэробные микроорганизмы разделялись на основе микроскопических исследований и морфологии культуры на *Propionibacterium* spp. и другие анаэробные микроорганизмы. Для *Clostridia* и *Bacillus* spp. было предписано дальнейшее разделение.

Было установлено наличие следующих категорий микроорганизмов: для *S. aureus*, β -гемолизирующих стрептококков, энтерококков, фекальных микроорганизмов, *P. aeruginosa*, *C. albicans*, *Clostridia* и палочковидных бактерий таксономия на уровне видов. Оставшиеся обнаруженные микроорганизмы были разделены на следующие категории: *Staphylococcus* spp. (CNS), *Streptococcus* spp., аэробные дифтероиды, бактерии, не вызывающие брожение, *Propionibacterium* spp. и другие анаэробные микроорганизмы.

2.4.3 Документирование

Порядок тестирования регистрировался в журнале, и наблюдения непрерывно заносятся в журнал лаборантом-исследователем. В случае обнаружения роста бактерий проводилась консультация с заведующим лабораторией. Тесты, в которых был обнаружен рост, регистрировались в списке ежемесячных данных и заносятся в таблицу excel. Эти списки непрерывно оценивались и использовались для внутреннего контроля качества.

Полученные результаты заносятся в форму для данных и передавались в службу костного банка. Эти результаты являлись основанием для конечного заключения о возможности применения трансплантата. В случае если рост бактерий не был обнаружен, это являлось, в дополнение к серологическим данным об отсутствии инфекции, дополнительным критерием для положительной оценки с микробиологической точки зрения, позволяющей передать препарат для трансплантации.

Если в какой-либо из приготовленных культур был обнаружен рост микроорганизмов, то передача трансплантата была невозможна, и трансплантат выбрасывался.

3 Результаты

Всего в исследование было включено 2458 трансплантатов. Что касается образцов костной ткани, взятых перед термической дезинфекцией, то рост микроорганизмов был обнаружен у 223 (9.07%) из них.

Из образцов жидкости, полученной после дезинфекции 2458 трансплантатов, рост бактерий был обнаружен в трех случаях (0.12%). Эти три случая приходились на первый

месяц применения термической дезинфекции с использованием Марбургской системы костного банка Lobator SD 1.

Подробное описание полученных результаты представлено в таблицах 1 и 2.

Таблица 1. Выявление микроорганизмов в образцах костной ткани после взятия трансплантатов (перед термической дезинфекцией).

Год	Количество (абсолютное)			Количество (относительное) [%]
	Трансплантаты	Отсутствие роста	Наличие роста	Рост, %
1994 (ноябрь и декабрь)	127	120	7	5.51
1995	849	776	73	8.60
1996	770	697	73	9.48
1997	712	642	70	9.83
Итого (1994 - 97)	2.458	2.235	223	9.07

Таблица 2. Выявление микроорганизмов в дезинфицированной жидкости после термической дезинфекции.

Год	Количество (абсолютное)			Количество (относительное) [%]
	Трансплантаты	Отсутствие роста	Наличие роста	Рост, %
1994 (ноябрь и декабрь)	127	124	3	2.36
1995	849	849	0	0.00
1996	770	770	0	0.00
1997	712	712	0	0.00
Итого (1994 - 97)	2.458	2.455	3	0.12

3.2 Типы обнаруженных микроорганизмов

Из 223 инфицированных образцов костной ткани в семи образцах было обнаружено несколько разных типов бактерий. Распределение микроорганизмов представлено в виде списка, составленного по ранжиру в таблице 3.

Таблица 3. Распределение микроорганизмов (в образцах губчатого вещества кости) 1994-97. Список, составленный по ранжиру.

n= 238 для 223 трансплантатов (у 7 трансплантатов было обнаружено наличие более одного вида микроорганизмов)

Типы микроорганизмов	Количество	
	абсолютное	относительное

		[%]
1. Propionibacterium spp.	131	55.04
2. Staphylococcus spp. (CNS)	80	33.62
3. Аэробные дифтероиды	16	6.37
4. Другие анаэробные агенты (не считая Clostridia)	8	3.36
5. Не вызывающие брожение	2	0.84
6. Streptococcus spp.	1	0.42
Итого	238	100.0

Примечания: CNS = коагулазоотрицательные стафилококки; Не вызывающие брожение = за исключением P. aeruginosa; Streptococcus spp. = не относящиеся к группам А-С, Е-Ф по классификации Лансфилд (Lancefield) или к Enterococcus spp.

Подробно распределение выделенных микроорганизмов представлено в следующей таблице (таблица 4).

Таблица 4. Распределение типов микроорганизмов (1994 - 97) по годам.
n= 238 для 223 трансплантатов (у 7 трансплантатов было обнаружено наличие более одного типа микроорганизмов)

Год	Типы микроорганизмов							>1 типа микроорганизмов / трансплантат
		Пропионибактерии	Staph. spp. (CNS)	Дифтероиды	Другие анаэробные микроорганизмы	Не вызывающие брожение	Streptococcus spp.	
1994	3	2	2	0	0	0	0	
1995	46	21	3	5	0	0	2	
1996	44	22	6	2	1	0	2	
1997	38	35	5	1	1	1	3	
Итого	131	80	16	8	2	1	7	

Примечания: 1994 = ноябрь и декабрь; 1995 - 97 = в каждом по 12 месяцев; Propionibact. = Propionibacterium spp.; Staph. spp. (CNS) = коагулазоотрицательные стафилококки; дифтероиды = аэробные дифтероиды; Не вызывающие брожение = за исключением P. aeruginosa; Streptococcus spp. = не относящиеся к группам А-С, Е-Ф по классификации Лансфилд (Lancefield) или к Enterococcus spp.

В образцах дезинфицированной жидкости был обнаружен рост бактерий, относящихся к коагулазоотрицательным стафилококкам, в трех случаях, в то время как соответствующие образцы губчатого вещества кости, полученные перед термической дезинфекцией, оказались стерильными.

4 Обсуждение

4.1 Микроорганизмы, выделенные перед термической дезинфекцией

В ходе исследования у 223 (9.07 % от общего количества) образцов кости из 2458 трансплантатов, взятых в операционной при проведении первичного эндопротезирования тазобедренного сустава, был обнаружен рост бактерий. Количество культур, в которых был выявлен рост микроорганизмов, незначительно увеличилось (с 1995 до 1997). До настоящего времени в лаборатории не обнаружена причина этого увеличения. Не было никакого изменения обработки и подготовки первичных культур.

Относительное количество образцов, взятых из костных трансплантатов и имеющих признаки роста бактерий, согласно литературным данным варьирует от менее чем 1 % до 92 %. (2, 3, 4, 5, 6). Однако эти данные трудно сравнивать вследствие различия использованных методов, обладающих разной чувствительностью, а также вследствие того, что в некоторых исследованиях использовались трансплантаты, взятые как от трупов, так и от живых доноров.

В этом исследовании была поставлена цель исключить живых доноров, имеющих заражение слабопатогенными микроорганизмами в месте взятия трансплантата. Доноры, для которых после обследования, проводимого во время операции, возникало подозрение на наличие заражения, исключались из исследования перед взятием головки бедренной кости. Для приготовления микробиологических культур с целью исследования заражения кости мы использовали образец губчатого вещества головки бедренной кости. Как убедительно показали M. R. Veer с соавт. (5), биопсия кости является подходящим методом для оценки наличия бактерий в костной ткани. Чувствительность метода биопсии кости для оценки роста бактерий выше, чем у метода взятия мазков независимо от того, используются ли при этом обогащённые культуры. К сожалению, наличие бактерий не означает автоматически наличие инфекции.

4.1.1 Значение выделенных микроорганизмов

Вследствие активной деятельности людей в операционной микроорганизмы бактериальной флоры кожи человека обнаруживаются в воздухе, несмотря на то, что воздух, прошедший через фильтры установки для кондиционирования воздуха, является стерильным. Другим важным источником бактерий является бактериальная флора пациента. Большинство случаев бактериального заражения образца, по всей видимости, связано с загрязнением, источником которого является бактериальная флора человека, контактирующего с поверхностью образца во время получения трансплантата. Дополнительным источником загрязнения является обработка образца в лаборатории. Здесь мы могли контролировать степень бактериального заражения, используя бокс с системой очистки воздуха.

Отсортированное по ранжиру распределение микроорганизмов в этом исследовании отличается от распределения бактерий в воздухе стерильных помещений, указанного Шульцем (H. Schulz, на которого ссылается Wailhauser, 1995) (7) и распределения, обнаруженного на коже человека Майбахом и Али (Maibach and Aly) (8). Согласно данным Шульца в воздухе стерильных комнат было обнаружено приблизительно 65 %

коагулазоотрицательных стафилококков, 20 % микрококков, 10 % палочковидных бактерий и менее 5 % дрожжевых грибов. Другие бактерии представлены в небольшом количестве и не перечислены поименно. Эти данные хорошо согласуются с нашими наблюдениями при использовании образцов воздуха, взятых при хирургических процедурах, однако в распределении микроорганизмов, обнаруженных в этом исследовании, отмечена высокая встречаемость дифтероидных грамположительных палочковидных микроорганизмов (пропионибактерий или аэробных микроорганизмов). Эти бактерии являются обычными представителями резидентной флоры кожи человека (Maibach and Aly). Данные бактерии могут загрязнять операционное поле при проведении процедуры и попадать в послеоперационную рану. Предполагается, что эти микроорганизмы попадают сюда, скорее непосредственно с кожи, чем из зараженного воздуха. Иначе высокая встречаемость пропионибактерий является необъяснимой.

Наличие образцов, имеющих признаки заражения, было связано с асептической послеоперационной раной. Fitzgerald с соавт. (9) показал, что встречаемость заражения при ортопедической хирургии составляет 30 %. Эти бактерии переносятся с воздухом и располагаются на участках кожи пациента, окружающих послеоперационную рану. Другие авторы, работавшие с костными трансплантатами, сообщают о встречаемости заражения, составляющей от менее 1 % до 92 % у образцов, взятых из костной ткани в "стерильных" условиях (2, 3, 4, 5, 6). Этот широкий диапазон можно объяснить использованием разных методов обработки. Другим возможным объяснением является то, что в некоторые исследования включены данные, полученные при использовании трупных трансплантатов. Так Deukers с соавт. (4) использовали более одного такого трансплантата, и показали, что встречаемость бактериального заражения увеличивается с увеличением времени, прошедшего до момента взятия трансплантата.

В наше исследование были включены только живые доноры, которым было сделано первичное эндопротезирование с использованием искусственного тазобедренного сустава. От этих доноров были получены для трансплантации только препараты головки бедренной кости.

Регистрируемая встречаемость бактериального заражения зависит от двух основных факторов: чувствительности метода, использованного для обнаружения микроорганизмов, и от площади поверхности, которая может быть инфицирована. В наших условиях значение этих факторов для заражения оказалось довольно небольшим.

Мы обнаружили в верхнем слое агара только две или три колониеобразующие единицы, таким образом, общее количество микроорганизмов в образце было довольно низким. Метод Лоденкампера (Lodenkamper) с использованием поверхностных культур, при котором образец погружают в питательный агар, позволяет выявить наличие колониеобразующих единиц факультативных анаэробных и анаэробных бактерий, а также (с небольшими ограничениями) строгих аэробных бактерий.

На основании данных, полученных из литературы (5), и особенно на основании неопубликованного исследования Garrell и Muters с соавт. (10) можно расположить в ряд методы в зависимости от их чувствительности: методы прямого обогащения бульона,

такие как, например, системы гемокультур, лучше методов фильтрации, и методы взятия мазков обладают меньшей чувствительностью, чем методы, указанные выше.

4.2 Микроорганизмы, выделенные после термической дезинфекции

Для обнаружения бактерий, оставшихся после термической дезинфекции, были использованы методы прямого обогащения. Применявшийся метод оказался пригодным для использования благодаря своей высокой чувствительности.

В трех случаях после обработки с помощью системы Lobator sd 1 были обнаружены микроорганизмы *Staphylococcus spec.* (CNS). Выделенные микроорганизмы были получены в течение первого месяца применения Марбургской системы костного банка. После этого первого месяца микроорганизмы не обнаруживались в течение более чем трех лет. Мы пришли к выводу о том, что наличие этих микроорганизмов было связано с проблемами, касающимися работы с препаратами при освоении новой системы (короткий период обучения), и их источником являлась кожная флора лаборантов при работе с образцами жидкости, полученной после дезинфекции.

5 Заключение

Марбургская система костного банка с использованием установки Lobator sd 1 эффективно убивает микроорганизмы, вызывающие загрязнение костных трансплантатов (головки бедренной кости), взятых от живых доноров. Кроме того, эта система термической дезинфекции способна инактивировать вегетативные формы бактерий (но не споры) и, по-видимому, особенно подходит для обработки костных аллогенных трансплантатов, взятых от живых доноров, в случаях когда ожидается, что общее количество микроорганизмов будет небольшим. Полученные нами данные убедительно показывают, что при надлежащем применении Системы костного банка Lobator использование аэробных и анаэробных культур для трансплантата больше не требуется для скрининга трансплантатов при бактериальном заражении слабопатогенными микроорганизмами. Однако эти бактериальные культуры имеют значение для внутреннего контроля процессов, а также и для скрининга трансплантатов, взятых от инфицированных доноров или зараженных высокопатогенными микроорганизмами, такими как *Escherichia coli* или *Salmonella spec.* Для минимизации риска инфекции костной ткани у реципиентов трансплантатов мы рекомендуем не использовать трансплантаты, взятые от зараженных доноров или инфицированные высокопатогенными микроорганизмами.

Методы, использующиеся для выявления микроорганизмов, должны обладать высокой чувствительностью, и следует разработать международные стандарты антимикробной обработки костных трансплантатов.

6 Литература

1 Lodenkamper, H, Stienen, G.: Zur Therapie anaerober Infektionen. Dtsch. med. Wschr. 81 (1956)1226-1231

- 2 Hosted, H., Kramhoft, M.U.: Microbiology of femoral head grafts in bone banks. Ugeskr Laeger 28 (1996)62604262
- 3 Knaebler, H., Garrell v. T., Seipp, H. M., Ascherl, R.: Experimentelle Untersuchungen zur thermischen Desinfektion und Sterilisation allogener Knochentransplantate und deren Auswirkungen auf die biologische Wertigkeit. Der Unfallchirurg 95 (1992) 477-485
- 4 Deijkers, R. L M., Bloem, R. M., Petit, P. L. M., Brand, R., Vehmeyer, S. B. W., Veen, M. R.: Contamination of bone allografts. J Bone Joint Surg [Br] 79-B (1997) 161 -1 66
- 5 Veen, M. R., Bloem, R. M., Petit, P. L. C: Sensitivity and negative predictive value of swab cultures in musculoskeletal allograft procurement. Clinical Orthopaedics and Related Research No. 300(1994) 259-263
- 6 Garrison C. P., Morse, B.: Comparison of bacterial contamination of cadaveric bone allografts collected under operating room and morgue conditions with and without the use of a decontamination process. AATB 17th Annual Meeting 1993, Oct. 22nd – 25th, Boston, USA
- 7 Schulz, H.: Bedeutung des Menschen als Kontaminationsquelle. Pharma Techn J 1 1 (1990) 31-32
- 8 Maibach, H. J., Aly, R.: Skin Microbiology. Springer, New York, 1981, p. 234
- 9 Fitzgerald, R. H., Peterson, L. S. A., Washington II, J. A., van Scoij, R. E., Coventry, M. E.: Bacterial colonization of wounds and sepsis in total hip arthroplasty. J Bone Joint Surg A 55-A (1973) 1242-1250
- 10 Garrell, v. T., Mutters, R., Garbas, J., Junge, A., Gotzen, L: Optimization of microbiological screening for bacterial contamination in allogenic bone transplants - Comparative study of various microbiological investigative techniques. Manuscript as yet unpublished - personal communication, 1998.

7 Адрес для корреспонденции

Ларс Фроммельт (Lars Frommelt), MD
Bakteriologisch Serologisches Labor
ENDO-KLINIK
Holstensfr. 2
0-22767 Hamburg,
Germany
(Гамбург Германия)

e-mail: lars.frommelt@t-online.de

Версия 980525 / L.F.