



Оценка эффективности "Марбургской системы костного банка" для термодезинфекции аллогенных костных трансплантатов головки бедра с использованием определенных бактерий, грибов и спор

Axel Pruss^{a*}, Michael Seibold^b, Frank Benedix^a, Lars Frommelt^c, Thomas von Garrel^d, Lutz Gürtler^e, Yvonne Dörffel^f, Georg Pauli^g, Ulf Berthold Göbel^h

^a*Institute for Transfusion Medicine (Tissue Bank), University Hospital Charité, CCM, Medical Faculty of Humboldt University, Schumannstr. 20/21, Berlin D-10117, Germany*

^b*Robert Koch-Institut, Mycology, Berlin, Germany*

^c*Institute for Infectiology, Clinical Microbiology and Infection Control, ENDO Clinic, Hamburg, Germany*

^d*Clinic for Traumatology, Philipps University, Marburg, Germany*

^e*Loeffler Institute for Medical Microbiology, Ernst Moritz Arndt University, Greifswald, Germany*

^f*Outpatients Clinics, University Hospital Charité, Medical Faculty of Humboldt University, Berlin, Germany*

^g*Robert Koch-Institut, Retrovirology, Berlin, Germany*

^h*Institute for Microbiology and Hygiene, University Hospital Charité, Medical Faculty of Humboldt University, Berlin, Germany*

Received 30 June 2003; accepted 28 August 2003

Резюме

Марбургской система костного банка "Lobator SD-2" широко получения головок бедренных костей человека тепловой дезинфекцией в асептического операционных. Эффективность термодезинфекции с использованием недавно разработанной модели головки бедра была подтверждена в соответствии с действующими стандартами. Исследовались следующие микроорганизмы, бактерии и грибки, взятые из Коллекции Американского банка микроорганизмов (American Type Culture Collection): *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* including spores, *Clostridium sporogenes*, *Mycobacterium terrae*, *Candida albicans* and споры *Aspergillus niger*. Высоко концентрированная суспензии этих микроорганизмов была внесена в центр бедренных головок. Уменьшение количества микроорганизмов определяли путем подсчета колониеобразующих единиц (КОЕ) до и после обработки в испытательном устройстве Lobator SD-2.

Вегетативные формы бактерий, грибов и споры грибов были полностью инактивированы (понижающий коэффициент R6 log 10). Количество спор спор, термостойких, как известно, *B. subtilis* и *C. sporogenes*, было уменьшено на один-два порядка. Эти бактерии служат моделями спорообразующих патогенов, которые не определяются в бедренных головках от живых доноров. Посредством термической дезинфекции головок бедра человека от живых доноров с использованием Марбургской системы костного банка достигается высокий уровень безопасности по отношению к клинически значимым патогенам. Для дальнейшего повышения безопасности термически обработанных головки бедра, мы рекомендуем принимать во внимание историю болезни и текущее состояние донора, а также данные необходимых серологических тестов.

© 2003 The International Association for Biologicals. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Thermodisinfection; Bone transplant; Tissue banking; Lobator; Bone bank; Pathogen transmission

1. Введение

Introduction

В последние годы микробиологическая безопасность пересадок тканей, полученных из человеческих и животных источников привлекала большое внимание [1,2]. Аллогенные трансплантаты кости связывали с передачей вирусов, бактерий и грибов [3-5].

Бактериальная и грибковая контаминация костных трансплантатов может быть следствием инфицированной донора или происходить во время получения. Трансплантаты кости (т.е. головки бедренных костей) могут быть получены либо из живых доноров или от трупов.

Такие трансплантаты используются, например, в хирургии позвоночника, пересадке искусственного сустава и реконструкции обширных костных дефектов. В США в год трансплантируют 300000-400000 аллогенных костных трансплантатов [6].

* Corresponding author. Tel.: +49-30-450525161; fax: +49-30-450525976

E-mail address: axel.pruss@charite.de (A. Pruss).

Table 1 Уровни микробной контаминации ткани при трансплантации аллогенных костей

Исследования	Костный трансплантат/ уровень контаминации	Микроорганизм
Husted et al. [8]	110/1%	<i>S. aureus</i>
Barrios et al. [44]	98/6.6%	80% Gram-positive bacteria 20% Gram-negative bacteria
Martinez [45]	21971/8.9%	734 × <i>Staphylococcus</i> spp. 342 × <i>Propionibacterium</i> spp. 249 × <i>Streptococcus</i> 192 × aerobic Gram-negative bacteria 173 × <i>Clostridium</i> spp.
Tomford et al. [16]	303/10%	90% <i>Propionibacterium acnes</i> and <i>S. epidermidis</i> , 10% non-hemolytic Streptococci and <i>S. aureus</i> (<2%)
Chapman et al. [43]	35/22.8%	4 × <i>S. epidermidis</i> 1 × <i>S. aureus</i> 1 × <i>Streptococcus</i> group F 1 × <i>H. influenzae</i> 1 × Gram-positive Diphtheroids
Fitzgerald et al. [28]	658/30%	33% <i>S. epidermidis</i> 22% <i>P. acnes</i> 14% <i>Aspergillus</i> spp. 11% <i>Corynebacterium</i> spp. 9% <i>Streptococcus viridans</i>
Doppelt et al. [42]	91/37%	62% <i>S. epidermidis</i> 38% mixed cultures
Deijkers et al. [11]	1999/53%	999 × microorganisms with low pathogenicity (e.g. Coagulase-negative Staphylococci [CNS], <i>Corynebacterium</i> spp.) 57 × microorganisms with high pathogenicity (e.g. <i>Streptococcus</i> spp. and <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Candida</i> spp.)
Veen et al. [9]	75/92%	64 × CNS 5 × <i>Corynebacterium</i> spp. 4 × <i>Bacillus</i> spp. 3 × <i>S. aureus</i>

Хотя разработаны и другие материалы для процедур замещения и реконструкции кости, есть растущий спрос на костные аллогенные трансплантаты [7].

1.1. Уровень контаминации

Трансплантаты загрязняются в первую очередь патогенами, передающимися от донора. Они, как правило транспортируются в костную ткань при бактериемии или вирусемии. Вторичное загрязнение может происходить во время удаления и / или последующей обработки трансплантата или во время имплантации. По опубликованным данным, бактериальное загрязнение аллогенных костных трансплантатов колеблется в широких пределах от 1% [8] до 92% [9]. Этот широкий разброс из-за различных методов, используемых для обнаружения бактерий.

Риск контаминации возрастает при увеличении числа лиц, присутствующих в операционной комнате во время трансплантации [10]. Было показано, что количество колониеобразующих единиц (КОЕ) в операционной комнате, когда в ней находятся пять человек находятся примерно в 37 раз выше по сравнению с пустой операционной. Аналогичное исследование показало, что уровень загрязнения зависит от количества лиц, участвующих в удалении и дальнейшей обработке трансплантата [11].

Кроме того, уровень бактериального загрязнения в операционной может быть снижен путем ограничения количества вовлеченных людей и их физической активности [12]. Беттин и сотрудники считают, что воздух в операционной комнате, персонал, а также хирургические инструменты, выступают в качестве возможных источников бактериального загрязнения [13]. Таким образом, скорость загрязнения зависит от ряда различных факторов.

Обзор результатов исследований, касающихся скорости загрязнения при аллогенных трансплантациях кости, проведенных в стерильных и / или асептических условиях представлен в таблице 1.

1.2. Уровень инфицирования

При трансплантациях свежемороженой костной ткани в стерильных условиях сообщают об уровне инфицирования, начиная с 4% до 17,5% [14,15]. В последующих исследованиях 303 костных трансплантаций сообщено о 21 случаях инфицирования (6,9%), включая некоторые случаи серьезного инфицирования *Staphylococcus aureus* and *S. epidermidis*. [16]. После аллогенной трансплантации костной ткани, у 33 из 283 пациентов (11,7%) развилась бактериальная инфекция с либо грамположительных бактерий (55%) либо грамотрицательных бактерий (18%) или смешанными культурами (27%).

Грамположительный бактериальный спектр состоял из *S. epidermidis* (67%), *S. aureus* (22%) и α -haemolytic streptococci (11%). Грамотрицательный бактериальный спектр: *Proteus* spp. и *Pseudomonas* spp. были также обнаружены у 33%. Кроме того, были обнаружены *Escherichia coli* и *Bacteroides fragilis*. Среди смешанных инфекций на энтерококки приходилось 56% и они также являлись наиболее распространенными видами. Также были обнаружены другие патогены: *Enterobacter* spp., *Pseudomonas* spp. and *Proteus* spp. [17].

Случай заражения *Mycobacterium tuberculosis* посредством аллогенного костного трансплантата был зафиксирован в 1953 году [18]. В настоящее время, доноры с открытой формой туберкулеза или с туберкулезом в анамнезе исключены из донорства [19]. Достоверный источник сообщал о смертельной сепсисе от инфекции *Clostridium sordellii* через 24 ч после реконструктивной операции на колене, хотя трансплантация проходила в асептических условиях. Тем не менее, трансплантат в данном случае не был подвергнут процедуре окончательной стерилизации или дезинфекции [20].

Была зарегистрирована передача болезни Крейтцфельда-Якоба (CJD) при трансплантации твердой мозговой оболочки и роговицы [21-24]. Хотя риск передачи CJD при трансплантации костной ткани в настоящее время считается крайне низким [25-28], люди с риском развития нового варианта CJD, исключены из доноров кости.

Это исследование было проведено для проверки эффективности термоинактивации для сокращения количества бактериальных патогенов. В головки бедренных костей (диаметр <56 мм) экспериментально вносили определенные микроорганизмы или спор и обрабатывались их в системе Lobator SD-2. Исследование было проведено в соответствии со следующими стандартами: Европейский стандарт EN 1040 "Химические дезинфектанты и антисептики. - Основная бактерицидная активность", который описывает руководящие принципы для определения бактерицидного эффекта за счет сокращения числа жизнеспособных бактерий по меньшей мере на коэффициент $5 \log_{10}$ [29] и Европейский стандарт EN 13624 "Количественный суспензионный тест для оценки фунгицидной активности химических дезинфицирующих средств для обработки медицинских инструментов", который рекомендует уменьшение на $\geq 5 \log_{10}$ [30]. Для исследования процедуры тепловой инактивации была разработана модель, где патогены непосредственно вводились в костную ткань [31].

2. Материалы и методы

2.1. Система 'Lobator sd-2'

Система термической дезинфекции аллогенных бедренных головок «Lobator SD» была разработана около 10 лет назад [32-36]. Настоящая статья посвящена версии SD-2 (рис. 1).



Fig. 1. Marburg bone bank system (Lobator sd-2).

Головки бедренных костей, полученные в ходе операции замены тазобедренного сустава были помещены в стерильных условиях в жесткий пластмассовый контейнер для дезинфекции после того, как хрящ был удален. Контейнер при комнатной температуре заполнялся до отметки примерно 300 мл стерильного раствора Рингера (Браун, Melsungen, Germany). В нижней части контейнера для дезинфекции содержалась магнитная мешалка, обеспечивающая непрерывную циркуляцию воды, чтобы гарантировать равномерное распределение тепла в процессе дезинфекции. Контейнер герметизировали с помощью плотно прилегающей крышки и переносили в нагревательное устройство.

По техническим соображениям температура измерялась у наружной стенки контейнера. Для бедренных головок с диаметром 56 мм производитель системы дезинфекции гарантирует температуру, по крайней мере 82,5 C в центре головки бедренной кости в течение минимум 15 мин. Температурный режим (фаза нагрева, плато и фазу охлаждения) в устройстве запрограммирован изготовителем и не может быть изменен пользователем, после завершения процесса дезинфекции печатался отчет со следующими данными: номер устройства и идентификационный номер, дата и время. Запись температуры нагревательного устройства велась в ходе процесса непрерывно каждые 3 мин. Этот отчет служит доказательством процесса дезинфекции и дает информацию о том, был ли завершен процесс как требуется.

2.2. Температура ядра в модели головки бедра

Недавнее исследование показало, что температура ядра, по крайней мере 82,5 C, поддерживается в центре головки бедренной кости в течение периода не менее 15 мин, если диаметр головки не превышал 56 мм [31].

2.3. Тест-организмы

: *S. epidermidis*, *S. aureus*, *Enterococcus faecium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *C. sporogenes* and *Bacillus subtilis*. *M. terrae*, *M. tuberculosis*, *C. albicans*, *Aspergillus niger*.

Table 2
Incubation conditions and cultivation media

Micro-organism	Incubation time/temperature	Medium
<i>S. aureus</i> (ATCC 6538)	48 h/37 °C	Casein soy peptone agar (Merck)
<i>S. epidermidis</i> (ATCC 12228)	48 h/37 °C	Casein soy peptone agar (Merck)
<i>E. faecium</i> (ATCC 6057)	48 h/37 °C	Casein soy peptone agar (Merck)
<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 15442)	48 h/37 °C	Casein soy peptone agar (Merck)
<i>B. subtilis</i> (ATCC 6633)	48 h/37 °C	Casein soy peptone agar (Merck)
<i>B. subtilis</i> spores (ATCC 6633)	48–72 h/37 °C	Casein soy peptone agar (Merck)
<i>C. sporogenes</i> (ATCC 19404)	48 h/37 °C	Casein soy peptone agar (Merck)
<i>M. terrae</i> (ATCC 15755)	3–4 weeks/37 °C	Middlebrook 7H10 Agar+OADC (Becton Dickinson)
<i>C. albicans</i> (10231)	48 h/37 °C	Malt extract agar (Merck)
<i>A. niger</i> spores (ATCC 16404)	48–72 h/30 °C	Malt extract agar (Merck)

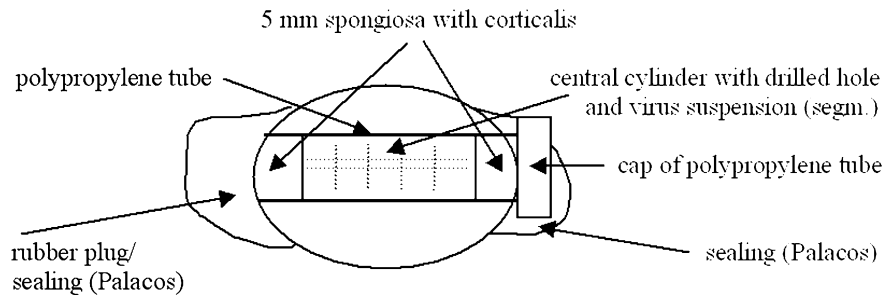


Fig. 2. Schematic drawing of the process-challenge device.

Table 2 compiles the test organisms (stocks of the Robert Koch-Institut, Berlin) and their respective growth conditions.

For bacteria, fungi and their spores starting suspensions were prepared with titres ranging from 1×10^8 cfu/ml and 5×10^8 cfu/ml by determining the optical density of each suspension in an ELISA reader (Dynatech MR 5000, Guernsey Channel Island, UK) and were determined as colony-forming units per ml (cfu/ml) by two independent titrations. Spores of *A. niger* and *B. subtilis* were counted in a modified counting chamber (in-house) and the titre calculated.

2.4. Process-challenge devices

As process-challenge devices (see Fig. 2) human femoral heads were used which measured 55 ± 1 mm in diameter after removal of cartilage and soft tissue [31]. The femoral heads were obtained during primary hip surgery. All donors met the requirements of the current national guidelines for bone banks [19].

A bone cylinder 15 mm in diameter was removed from the femoral head using a keyhole saw which was cooled continuously. The resulting tunnel through the femoral head was widened to 17 mm to accommodate a screw-capped polypropylene tube measuring 17 mm in

diameter (BD Falcon™ Conical Centrifuge Tubes, BD Biosciences Discovery Labware, Heidelberg). A Falcon tube of 120 mm was adapted to the length of the tunnel in the femoral head by cutting off the bottom part. The lower end of the polypropylene tube was tightly closed with a rubber plug. The lower part of the tube was then fixed by covering the rubber plug with Palacos® R bone cement (Heraeus Kulzer, Wehrheim, Germany).

At one end of the bone cylinder a 5 mm disc was removed to serve as a lid. Then a central hole with a diameter of 6 mm and a length of approx. 45 mm was drilled into the bone cylinder. The hole was drilled towards the bottom of the bone cylinder respecting a distance from the bottom of 5 mm. In this way it was guaranteed that the test suspension was in close contact with the surrounding bone tissue. The cylinder was sawed into segments of about 5 mm thickness to permit further processing of the bone cylinder in the Omni-Mixer (type OM, Ivan Sorvall Inc., Norwalk, USA). The bottom segment and the matching pierced cylinder discs were then inserted into the tube, followed by the lid segment. Finally the polypropylene tube was closed by a screw cap.

2.5. Contamination, thermoinfection, titration

The bone lid was removed from the polypropylene tube and approx. 1 ml of the respective suspension was pipetted into the drillhole at room temperature (20–25 °C). The lid was reinserted and the tube closed

with a screw cap. For each experiment (two different experiments at different times for every micro-organism) two devices were investigated. One of these was stored at room temperature and the second one was treated with the ‘Lobator sd-2’. After completion of the disinfection process—determined by the fixed programme of the Lobator—the suspension was harvested from the central cylinder (treated and untreated sample) to determine the cfu’s. Then the bone lid, the cylinder segments and the bottom disc were removed, placed in a sterile stainless steel container of an Omni-Mixer (Sorvall) in an ice-water bath and homogenized in 9 ml of sterile NaCl (0.9%) (Braun, Melsungen/Germany). The bone homogenate was allowed to settle at the bottom of the vessel and the supernatant fluid was removed. From the remaining cancellous bone homogenate, approx. 1 g, pathogens were eluted for 3 min with 4 ml sterile NaCl (0.9%) on a Vortex-Genie (WINN B.V., Tolbert, Netherlands). The microbial titres in both solutions were determined using the cultivation conditions given in Table 2.

The concentration of *B. subtilis* spores was determined by the plate-pouring method (1 ml spore suspension and 19 ml agar-containing growth medium). The titres were determined, taking the dilution factors into account.

The detection limit of both methods was found at ≤ 10 cfu/ml. The titre reduction is defined as the difference between the number of cfu’s of the unprocessed samples and those of the samples processed with the ‘Lobator sd-2’.

3. Results

The results (Table 3) for the *supernatants* show that processing of femoral heads in the ‘Lobator sd-2’ system led to a titre reduction of $\geq 6 \log_{10}$ in the centre of human femoral heads for all pathogens tested, except for the *B. subtilis* spores and *C. sporogenes*. For *B. subtilis* spores (0.77 and 1.36 \log_{10}) and *C. sporogenes* (1.85 and 1.73 \log_{10}) no significant reduction was observed.

In the *homogenates* (supernatant from the bone cylinder homogenization) a titre reduction of at least 5 \log_{10} was achieved for all pathogens tested, except for spores of *B. subtilis* (0.60 and 1.24 \log_{10}) and *C. sporogenes* (1.58 and 1.78 \log_{10}). Due to a low starting titre in the *A. niger* experiment I, only a titre reduction of 4.43 \log_{10} in the homogenate was found.

For the *cancellous bone* (elution from the remaining bone in the homogenate) a reduction of about at least 4 \log_{10} was achieved, except for *A. niger* (due to process engineering), *B. subtilis* spores and *C. sporogenes*. In Experiment I for *A. niger* the reduction only amounted to $\geq 3.15 \log_{10}$. The reductions for *B. subtilis* spores (0.33 and 1.15 \log_{10}) and *C. sporogenes* (1.34 and 1.77 \log_{10}) were both low.

In Table 3 the initial titres and the results of the positive control (incubation of the contaminated femoral head at room temperature) are also given. Recovery rates in the positive controls corresponded to the respective titres of the test suspension.

4. Discussion

Over the last ten years numerous national and international recommendations and guidelines have been published to reduce or completely exclude the risk of transmitting an infection by allogenic bone transplants [19,37–40]. The thermal instability of most clinically relevant micro-organisms and the disadvantages of alternative inactivation procedures, like loss of the mechanical properties of bone grafts, led to the development of the Marburg Bone Bank System [33], now available as the ‘Lobator sd-2’. This system was investigated using a test model that was especially developed to show the efficacy of thermal disinfection of femoral heads. In this study, a variety of clinically relevant bacteria, fungi and their spores are investigated respecting conditions prescribed by DIN or EN standards and following GLP requirements.

Heating to ≥ 82.5 °C, maintaining the temperature at 82.5 °C for at least 15 min and cooling from 82.5 °C to below 60 °C resulted in complete inactivation of vegetative forms of bacteria and fungi, including spores of *A. niger*. As expected, the bacterial spores were reduced in number to an irrelevant quantity using moderate moist heat exposure as in the system tested. However, these spores are usually not present in bone tissue procured under sterile conditions. Contaminations occur only when the basic principles of aseptic surgery are neglected. The results obtained here are in agreement with findings of Knaepler and co-workers showing complete inactivation ($\geq 6 \log_{10}$) of the vegetative form of *S. aureus*, *E. coli*, *Proteus vulgaris* and *P. aeruginosa* using moist heat of 80 °C for 10 min [32].

For *A. niger* spores, the exact calibration of a starting titre proved to be problematic. Lower recovery rates than in the other test organisms were observed. This may result from adhesion of hydrophobic conidia (spores) to the surface of plastic material like container walls, pipette tips or glass such as Drigalski’s spatula. Another possible explanation is that aggregation of conidia in an aqueous milieu can interfere with the method of counting the cfu’s. Although a loss of viability is conceivable in principle, this can be excluded based on practical experience. While validating a sterilization process using a mixture of peracetic acid/ethanol Pruss and co-workers found lower recovery rates than expected for *A. niger* [41].

The high thermal stability of bacterial spores could not be overcome by treatment in the ‘Lobator sd-2’. As

Table 3
Inactivation of bacteria and fungi using the 'Lobator sd-2'-system

Micro-organism	Starting titre (cfu/ml)		Positive control 94 min-(cfu/ml)		'Lobator sd-2' 94 min-(cfu/ml)		Titre reduction (log ₁₀)	
	experiment I	experiment II	experiment I	experiment II	experiment I	experiment II	experiment I	experiment II
<i>S. aureus</i> supernatant homogenate* bone**	1.6 × 10 ⁸	1.0 × 10 ⁸	3.2 × 10 ⁸	5.4 × 10 ⁷	≤ 10	≤ 10	≥ 7.51	≥ 6.73
			1.0 × 10 ⁷	3.0 × 10 ⁶	≤ 10	≤ 10	≥ 6.00	≥ 5.48
			1.8 × 10 ⁶	3.4 × 10 ⁵	≤ 10	≤ 10	≥ 5.26	≥ 4.53
<i>S. epidermidis</i> supernatant homogenate* bone**	7.5 × 10 ⁷	1.3 × 10 ⁸	2.1 × 10 ⁸	9.6 × 10 ⁷	≤ 10	≤ 10	≥ 7.32	≥ 6.98
			9.6 × 10 ⁶	1.4 × 10 ⁷	≤ 10	≤ 10	≥ 5.98	≥ 6.15
			1.4 × 10 ⁶	2.1 × 10 ⁶	≤ 10	≤ 10	≥ 5.15	≥ 5.32
<i>E. faecium</i> supernatant homogenate* bone**	5.0 × 10 ⁸	4.8 × 10 ⁸	7.3 × 10 ⁸	4.3 × 10 ⁸	≤ 10	≤ 10	≥ 7.86	≥ 7.63
			2.0 × 10 ⁷	3.8 × 10 ⁷	≤ 10	≤ 10	≥ 6.30	≥ 6.58
			2.5 × 10 ⁶	2.8 × 10 ⁶	≤ 10	≤ 10	≥ 5.40	≥ 5.45
<i>P. aeruginosa</i> supernatant homogenate* bone**	2.8 × 10 ⁸	2.7 × 10 ⁸	1.4 × 10 ⁸	1.1 × 10 ⁸	≤ 10	≤ 10	≥ 7.15	≥ 7.04
			2.2 × 10 ⁷	5.5 × 10 ⁶	≤ 10	≤ 10	≥ 6.34	≥ 5.74
			1.7 × 10 ⁶	1.3 × 10 ⁶	≤ 10	≤ 10	≥ 5.23	≥ 5.11
<i>M. terrae</i> supernatant homogenate* bone**	1.1 × 10 ⁸	5.7 × 10 ⁷	1.0 × 10 ⁸	5.3 × 10 ⁷	≤ 10	≤ 10	≥ 7.00	≥ 6.72
			4.9 × 10 ⁶	4.6 × 10 ⁶	≤ 10	≤ 10	≥ 5.69	≥ 5.66
			6.5 × 10 ⁵	3.7 × 10 ⁵	≤ 10	≤ 10	≥ 4.81	≥ 4.57
<i>C. sporogens</i> supernatant homogenate* bone**	3.6 × 10 ⁷	4.3 × 10 ⁷	3.5 × 10 ⁷	2.0 × 10 ⁷	4.9 × 10 ⁵	3.7 × 10 ⁵	1.85	1.73
			2.0 × 10 ⁶	1.8 × 10 ⁶	5.2 × 10 ⁴	3.0 × 10 ⁴	1.58	1.78
			1.7 × 10 ⁵	1.5 × 10 ⁵	7.7 × 10 ³	2.6 × 10 ³	1.34	1.77
<i>B. subtilis</i> supernatant homogenate* bone**	1.8 × 10 ⁸	5.0 × 10 ⁸	4.3 × 10 ⁷	4.8 × 10 ⁸	≤ 10	≤ 10	≥ 6.73	≥ 7.68
			1.0 × 10 ⁷	1.0 × 10 ⁷	≤ 10	≤ 10	≥ 6.00	≥ 6.00
			9.4 × 10 ⁵	1.0 × 10 ⁶	≤ 10	≤ 10	≥ 4.97	≥ 5.00
<i>B. subtilis</i> spores supernatant homogenate* bone**	5.5 × 10 ⁷	3.8 × 10 ⁷	1.5 × 10 ⁷	6.5 × 10 ⁷	2.6 × 10 ⁶	2.8 × 10 ⁶	0.77	1.36
			9.1 × 10 ⁵	6.0 × 10 ⁶	2.3 × 10 ⁵	3.5 × 10 ⁵	0.60	1.24
			1.4 × 10 ⁵	8.5 × 10 ⁵	6.6 × 10 ⁴	6.0 × 10 ⁴	0.33	1.15
<i>C. albicans</i> supernatant homogenate* bone**	1.9 × 10 ⁸	2.2 × 10 ⁸	2.2 × 10 ⁸	1.4 × 10 ⁸	≤ 10	≤ 10	≥ 7.34	≥ 7.15
			9.0 × 10 ⁶	5.9 × 10 ⁶	≤ 10	≤ 10	≥ 5.95	≥ 5.77
			8.8 × 10 ⁵	6.6 × 10 ⁵	≤ 10	≤ 10	≥ 4.94	≥ 4.82
<i>A. niger</i> supernatant homogenate* bone**	2.8 × 10 ⁷	5.3 × 10 ⁷	1.7 × 10 ⁷	6.6 × 10 ⁷	≤ 10	≤ 10	≥ 6.23	≥ 6.82
			2.7 × 10 ⁵	1.1 × 10 ⁶	≤ 10	≤ 10	≥ 4.43	≥ 5.04
			1.4 × 10 ⁴	1.5 × 10 ⁵	≤ 10	≤ 10	≥ 3.15	≥ 4.18

Supernatant=recovered from the drillhole. Homogenate=supernatant from the bone cylinder homogenization (1 part of bone, 9 parts of buffer). Bone=elution from the cancellous bone homogenate (1 part of bone, 4 parts of buffer).

* Homogenate diluted (1:10).

** Remaining cancellous bone from homogenate, diluted (1:5).

expected, only a slight reduction of titres by factor 0.74 and $1.07 \log_{10}$ was determined for spores of *B. subtilis*. It is conceivable in this context that the processing time of 94 min induced germination of the spores. Due to the nutrients available by direct bone contact and a favourable temperature, part of the spores could have been converted into the vegetative form during the heating and cooling phase. Germinating spores and vegetative forms of *B. subtilis* may have been destroyed and thus simulate a reduction of spores in number. On the other hand, aggregation of *B. subtilis* spores may mimic a reduction.

Also for *C. sporogenes* only a slight titre reduction ranging between 1.56 and $1.79 \log_{10}$ was observed. An explanation for this low inactivation factor is the rapid spore formation, which could already be observed in the inoculum. However, we assume that vegetative forms of *C. sporogenes* were inactivated, while spores survived. The use of another test organism (e.g. *Clostridium* spp.) with a lower tendency to develop spores could provide additional information on the actual capacity of the procedure to inactivate clostridia.

The risk of transmission of spores can be almost completely excluded for femoral heads since bone transplants from living donors are removed rapidly under sterile conditions. Under these circumstances only vegetative non-spore-forming bacteria are present and able to cause secondary contamination [35]. If spore-forming bacteria are present, microbiological testing of the thermal disinfection processing fluid is able to show these surviving micro-organisms. Femoral heads which show bacterial growth from the processing fluid are not acceptable as bone grafts and have to be discarded.

The virus-inactivating capacity of the ‘Lobator sd-2’ procedure has already been demonstrated in previous investigations [31]. The results published here show that the possible risk of transmitting bacterial and fungal infections appears to be extremely low for allogenic bone grafts processed with the Marburg Bone Bank System ‘Lobator sd-2’.

In conclusion, the ‘Marburg bone bank system’ appears to be safe and effective for the treatment of allogenic femoral heads from living donors.

Acknowledgements

The authors thank Mrs Antweiler, Mr Schurig and Mr Schweiger for their excellent technical assistance.

References

- [1] Kakaiya R, Miller WV, Gudino MD. Tissue transplant transmitted infections. *Transfusion* 1991;31(3):277–84.
- [2] Wilmes E, Gürtler L, Wolow H. Zur Übertragung von HIV-Infektionen durch allogene Transplantate. *Laryngo Rhino Otol* 1987;66:332–4.
- [3] CDC. Transmission of HIV through bone transplantation: case report and public health recommendations. *MMWR* 1988; 37:597–9.
- [4] Habal MB, Reddi AH. Bone grafts and bone substitutes. Philadelphia/London/Toronto: Saunders, 1992.
- [5] CDC. Hepatitis C virus transmission from an antibody-negative organ and tissue donor. *MMWR* 2003;52:273–6.
- [6] von Garrel T, Gotzen L. Allogene Knochentransplantation und Knochenbanking. *Unfallchirurg* 1998;101:713–27.
- [7] Jerosch J, Castro WHM, Granrath M, Rosin H. Knochenbanken in der BRD. *Unfallchirurg* 1990;93:334–8.
- [8] Husted H, Kramhoft MU. Microbiology of femoral head grafts in bone banks. *Ugeskr Laeger* 1996;158(44):6260–2.
- [9] Veen MR, Bloem RM, Petit PL. Sensitivity and negative predictive value of swab cultures in musculoskeletal allograft procurement. *Clin Orthop* 1994;300:259–63.
- [10] Ritter MA, French ML, Hart JB. Microbiological studies in a horizontal wall-less laminar air-flow operating room during actual surgery. *Clin Orthop* 1973;97:16–8.
- [11] Deijkers RL, Bloem RM, Petit PL, Brand R, Vehmeyer SB, Veen MR. Contamination of bone allografts: analysis of incidence and predisposing factors. *J Bone Joint Surg Br* 1997;79(1):161–6.
- [12] Fitzgerald RH Jr, Washington JA 2nd. Contamination of the operative wound. *Orthop Clin North Am* 1975;6(4):1105–14.
- [13] Bettin D, Buchholz B, Dietl KH, Harms C. The analysis of bacterial results in the kidney perfusion fluid and bone allografts in human multiorgan donors. *Cell and Tissue Banking* 2000; 1:313–6.
- [14] Regel G, Südkamp NP, Illgner A, Buchenau A, Tscherne H. 15 Jahre allogene Knochentransplantation. [15 years allogeneic bone transplantation. Indications, treatment and results]. *Unfallchirurg* 1992;95(1):1–8.
- [15] Südkamp NP, Haas NP, Tempka A, Veuskens A, Kirchoff A, Tscherne H. Indikation und Häufigkeit von Spongiosatransplantationen bei offenen Frakturen: Analyse von 470 offenen Frakturen. [Indications and incidence of cancellous bone transplantation in open fractures: analysis of 470 open fractures]. *Akt Traumatologie* 1993;23(4):169–77.
- [16] Tomford WW, Starkweather RJ, Goldman MH. A study of the clinical incidence of infection in the use of banked allograft bone. *J Bone Joint Surg Am* 1981;63(2):244–8.
- [17] Lord CF, Gebhardt MC, Tomford WW, Mankin HJ. Infection in bone allografts. Incidence, nature, and treatment. *J Bone Joint Surg Am* 1988;70(3):369–76.
- [18] James JIP. Tuberculosis transmitted by bone bank. *J Bone Joint Surg Br* 1953;35:578.
- [19] Wissenschaftlicher Beirat der Bundesärztekammer. Richtlinien zum Führen einer Knochenbank. *Deutsches Ärzteblatt* 2001;98(15):A1011–1016.
- [20] CDC. Update: Allograft-associated bacterial infections—United States 2002. *MMWR* 2002;51(10):207–10.
- [21] CDC. Creutzfeldt–Jakob disease in a patient receiving a cadaveric dura mater graft. *MMWR* 1987;36(21):324–5.
- [22] CDC. Creutzfeldt–Jakob disease in a second patient who received a cadaveric dura mater graft. *MMWR* 1989;38(3):37–8.
- [23] Duffy P, Wolf J, Collins G, De Voe AG, Streeten B, Cowen D. Possible person-to-person transmission of Creutzfeldt–Jakob disease. *N Engl J Med* 1974;290:692–3.
- [24] Thadani V, Penar PL, Partington J, Kalb R, Janssen R, Schonberger LB et al. Creutzfeldt–Jakob disease probably acquired from a cadaveric dura mater graft. Case report. *J Neurosurg* 1988;69(5):766–9.
- [25] EMEA/410/01/rev 1. Note for guidance on minimizing the risk of transmitting animal spongiform encephalopathy agents via

- human and veterinary medicinal products. Committee for proprietary medicinal products (CPMP) 2001, London.
- [26] Frommelt L. Mikrobiologische Aspekte der allogenen Knochen- transplantation. 63. Jahrestagung, Deutsche Gesellschaft für Unfallchirurgie e.V.; November 17–20, 1999, Berlin.
- [27] Sogal A, Tofe AJ. Risk assessment of bovine spongiform encephalopathy transmission through bone graft material derived from bovine bone used for dental applications. *J Periodontol* 1999;70(9):1053–63.
- [28] Fitzgerald RH Jr, Peterson LF, Washington JA 2nd, Van Scoy RE, Coventry MB. Bacterial colonization of wounds and sepsis in total hip arthroplasty. *J Bone Joint Surg Am* 1973;55(6):1242–50.
- [29] Europäische Norm EN 1040. Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika, Bakterizide Wirkung (Basistest). Prüfverfahren und Anforderungen. [Chemical disinfectants and antiseptics—Basic bactericidal activity] CEN (Europäisches Komitee für Normung) 1997, Brüssel.
- [30] prEN 13624. Quantitativer Suspensionsversuch zur Prüfung der fungiziden Wirkung chemischer Desinfektionsmittel für Instrumente im humanmedizinischen Bereich. [Quantitative suspension test for evaluation of fungicidal activity of chemical disinfectants for instruments used in the medical area]. Deutsches Institut für Normung (DIN), 1999.
- [31] Pruss A, Kao M, von Garrel T, Frommelt L, Gürtler L, Benedix F et al. Virus inactivation in bone tissue transplants (femoral heads) by moist heat with the ‘Marburg Bone Bank System’. *Biologicals* 2002;31:75–82.
- [32] Knaepler H. Thermische Spongiosa—Desinfektion. *MedReport* 1995;33:2–3.
- [33] Knaepler H, von Garrel T, Gotzen L. Untersuchungen zur Desinfektion und Sterilisation allogener Knochen- transplantate. *Unfallchirurg (Hefte)* 1994;235:1–101.
- [34] Knaepler H, von Garrel T, Seipp HM, Ascherl R. Experimentelle und klinische Untersuchungen zur thermischen Desinfektion allogener Knochen- transplantate und deren Einbauverhalten. *Orthop Praxis* 1992;1:23–7.
- [35] Knaepler H, von Garrel T, Seipp HM, Ascherl R. Experimentelle Untersuchungen zur thermischen Desinfektion und Sterilisation allogener Knochen- transplantate und deren Auswirkungen auf die biologische Wertigkeit. [Experimental studies of thermal disinfection and sterilization of allogeneic bone transplants and their effects on biological viability]. *Unfallchirurg* 1992;95(10):477–84.
- [36] von Garrel T, Knaepler H, Gürtler L. Untersuchungen zur Inaktivierung von HIV-1 in humanen Femurköpfen durch Verwendung eines thermischen Desinfektionssystems Lobator SD-1. [Inactivation of HIV-1 in human femur heads using a heat disinfection system (Lobator SD-1)]. *Unfallchirurg* 1997;100(5):375–81.
- [37] Bekanntmachung des Paul-Ehrlich-Institutes und des Bundesinstitutes für Arzneimittel und Medizinprodukte. Anforderungen an Validierungsstudien zum Nachweis der Virussicherheit von Arzneimitteln aus menschlichem Blut oder Plasma. *Bundesanzeiger* 1994;84:4742–4.
- [38] Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte. Bekanntmachung zu allogenen Gewebetransplantaten. *Bundesanzeiger* 1996;75:4670.
- [39] CPMP. Note for guidance on virus validation studies: The design, contribution and interpretation of studies validating the inactivation and removal of viruses. Final version BWP/268/95, London, February 1996.
- [40] CEN. Sterilization of medical devices utilizing tissues-validation of the inactivation of viruses and other transmissible agents. Final version 316/WG3/N-02, Brüssel, 1994.
- [41] Pruss A, Baumann B, Seibold M, Kao M, Tintelnot K, von Versen R et al. Validation of the sterilization procedure of allogeneic avital bone transplants using peracetic acid-ethanol. *Biologicals* 2001;29:59–66.
- [42] Doppelt SH, Tomford WW, Lucas AD, Mankin HJ. Operational and financial aspects of a hospital bone bank. *J Bone Joint Surg Am* 1981;63(9):1472–81.
- [43] Chapman PG, Villar RN. The bacteriology of bone allografts. *J Bone Joint Surg Br* 1992;74(3):398–9.
- [44] Barrios RH, Leyes M, Amillo S, Oteiza C. Bacterial contamination of allografts. *Acta Orthop Belg* 1994;60(2):152–4.
- [45] Martinez O. Microbiologic screening of cadaver donors and tissues for transplantation. 26th Annual Meeting, American Association of Tissue Banks. Boston, Massachusetts, August 2002.