

Extrakorporale hydrostatische Hochdruckbehandlung als neues Verfahren zur Desinfektion infizierter Knochenpräparate

Extracorporeal high hydrostatic pressure as a new technology for the disinfection of infected bone specimens

Patrick Weber^{1,2,*}, Peter Diehl³, Gunther O. Hofmann^{4,5}, Thomas Miethke⁶, Marcus Schmitt-Sody¹, Wolfram Mittelmeier³, Reiner Gradinger² und Hans Gollwitzer²

¹ Orthopädische Klinik und Poliklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München, Klinikum Grosshadern, München, Deutschland

² Klinik und Poliklinik für Orthopädie und Sportorthopädie, Technische Universität München, München, Deutschland

³ Klinik und Poliklinik für Orthopädie, Universität Rostock, Rostock, Deutschland

⁴ Berufsgenossenschaftliche Kliniken „Bergmannstrost“, Halle (Saale), Deutschland

⁵ Klinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie, Friedrich-Schiller-Universität Jena, Jena, Deutschland

⁶ Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene, Technische Universität München, München, Deutschland

Zusammenfassung

Hintergrund: Die allogene Knochentransplantation birgt ein hohes Infektionsrisiko, und etablierte Desinfektionsverfahren beeinträchtigen die Knochenqualität. Für hydrostatischen Hochdruck (HHD) wurde nachgewiesen, dass sich biomechanische und biologische Knocheneigenschaften nicht verändern. In der Lebensmitteltechnik wird HHD bereits zur Desinfektion verschiedenster Mikroorganismen eingesetzt. Die vorliegende Studie untersuchte erstmals HHD in der Desinfektion infizierter Knochenproben.

Material und Methode: Knochenchips von 34 Patienten mit chronischen Infektionen wurden in zwei Serien einer HHD-Behandlung unterzogen und anschließend auf bakterielles Wachstum untersucht. Serie 1: Druckbehandlung der Knochenchips direkt nach Biopsieentnahme (10 min; P_{\max} 600 MPa). Serie 2: Druckbehandlung mit unterschiedlichen Druckhaltezeiten (10 min bzw. 2×30 min, P_{\max} 600 MPa) nach vorheriger 5-tägiger Bakterienanreicherung in Nährmedium. Außerdem wurden

Knochenproben mit Referenzkeimen (*Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecium*) infiziert und Veränderungen der Bakterien nach HHD-Behandlung rasterelektronenmikroskopisch untersucht.

Ergebnisse: Serie 1: Bei direkter HHD-Behandlung explantierter Knochenchips ($n=17$) konnten 71% sterilisiert werden; 38% der bei der gleichen Operation gewonnenen unbehandelten Kontrollproben ($n=8$) waren steril. Serie 2: Nach vorheriger Bakterienanreicherung gelang eine Sterilisation durch HHD bei 7% der Versuchsproben ($n=55$); alle Kontrollproben zeigten Bakterienwachstum ($n=33$). Rasterelektronenmikroskopisch konnte bei gramnegativen Stäbchen nach HHD eine deutliche Alteration der Zellmorphologie beobachtet werden.

Schlussfolgerung: Das Verfahren HHD hat das Potenzial, Knochen ohne Beeinträchtigung der Qualität zu sterilisieren. Eine klinisch notwendige sichere Sterilisation in allen Fällen kann jedoch in der vorliegenden Untersuchung noch nicht gezeigt werden. Als Indikation scheinen Monoinfektionen mit barosensiblen gramnegativen Stäbchen und Hefen geeignet.

Schlüsselwörter: allogene Knochentransplantation; Bakterien; Desinfektion; hydrostatischer Hochdruck; Osteitis.

Abstract

Background: Allogeneic bone transplantation is at risk of infection, and established disinfection methods typically compromise bone quality. High hydrostatic pressure (HHP) is well established for disinfection in food technology, and also it does protect biomechanical and biological properties of bone. This study is the first investigation of HHP regarding disinfection of bone biopsies.

Materials and methods: Bone biopsies of 34 patients with chronic infections were subjected to HHP and assessed for persisting bacterial growth. In series 1, bone biopsies were proceeded directly to HHP (10 min; maximal pressure P_{\max} 600 MPa). In series 2, HHP was applied after 5-day incubation in growth media (10 min or 2×30 min; P_{\max} 600 MPa). Furthermore, HHP-induced changes of bacterial morphology on artificially infected bone samples were evaluated by scanning electron microscopy (SEM).

Results: For series 1, 71% of the bone samples were sterilised by HHP ($n=17$), compared to 38% of the untreated control samples, which were obtained during the same surgery ($n=8$). For series 2, after prior incu-

*Korrespondenz: Dr. med. Patrick Weber, Orthopädische Klinik und Poliklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München, Klinikum Grosshadern, Marchioninistr. 15, 81377 München, Deutschland
Tel.: +49-(0)89-70950
Fax: +49-(0)89-70952618
E-mail: Patrick.Weber@med.uni-muenchen.de

bation, HHP disinfected 7% of the bone specimens (n=55), all control samples showed bacterial growth (n=33). Destruction of cell wall integrity of Gram-negative strains was observed by SEM.

Conclusion: The effectiveness of HHP for bone disinfection should be improved by optimising treatment parameters. Infections with barosensitive Gram-negative bacteria or yeast might represent possible clinical indications.

Keywords: bacteria; bone transplantation; disinfection; high hydrostatic pressure; osteomyelitis.

Einleitung

Knochendefekte stellen in der orthopädischen Chirurgie, Unfallchirurgie und Wiederherstellungschirurgie nach wie vor eine große therapeutische Herausforderung dar. So gilt es unter anderem in der Revisionsendoprothetik, in der Tumorchirurgie, bei additiven Korrekturosteotomien, bei Defekten nach therapierten Knocheninfektionen und bei bestimmten Frakturen größere Knochendefekte zu ersetzen. Die heutigen Methoden wie die autogene, allogene und alloplastische Knochentransplantation, der Segmenttransport sowie die Endoprothetik sind allesamt mit wesentlichen Limitationen und potenziellen Komplikationen behaftet [18, 35, 41].

Allogener Knochen wird zumeist bei der Implantation von Hüfttotalendoprothesen gewonnen. Er hat eine gute biologische Wertigkeit, wenngleich diese auch dem autogenen Knochen unterlegen ist. Eine verheerende Komplikation ist jedoch das Übertragen von Bakterien oder Viren auf den Empfänger mit der Folge einer Infektion [31, 41]. Deshalb wurden verschiedene Sterilisationsverfahren für den Einsatz am Knochen geprüft. Jedoch gelingt es weder physikalischen Methoden wie der Autoklavierung [22, 25], der Wärmebehandlung [22, 36, 41] oder der Gamma-Bestrahlung [23, 35, 41] noch chemischen Methoden [35, 41], den Knochen sicher zu sterilisieren, ohne dabei seine biologische Potenz bzw. mechanische Stabilität erheblich zu reduzieren. Als mögliche Alternative sollte aus diesem Grund die hydrostatische Hochdrucktechnik (HHD) untersucht werden.

Der Einsatz von Hochdruck wird in der Lebensmittelindustrie bereits teilweise als Ersatz für die Pasteurisation praktiziert, beispielsweise zur Herstellung von Konfitüren, Pürees und Soßen. Durch die Anwendung von Hochdruck werden Mikroorganismen inaktiviert [20], wobei der für die Inaktivierung der Mikroorganismen notwendige Druck von der Mikroorganismenspezies abhängt. Weitreichende Untersuchungen haben gezeigt, dass Enzyme ebenfalls durch die Einwirkung von Hochdruck inaktiviert bzw. in ihrer Aktivität reversibel sowie irreversibel beeinflusst werden können [6, 14]. In einer Vielzahl von Publikationen ist die Wirksamkeit von HHD in der Größenordnung von 200 bis 600 MPa zur Sterilisation von Bakteriensuspensionen und Lebensmitteln in geleeartiger Konsistenz beschrieben worden [1, 2, 38]. Die Wirksamkeit als Desinfektionsverfahren in der medizinischen Anwendung wurde jedoch bisher noch nicht untersucht.

In ersten präklinischen Untersuchungen konnte ferner gezeigt werden, dass durch eine Behandlung mit HHD humane Tumorzelllinien bei 350 MPa sicher abgetötet werden können [10, 11], jedoch die biomechanischen Eigenschaften von Knochen, Knorpel und Sehnen selbst nach Behandlung mit HHD bis 600 MPa erhalten bleiben [9, 13, 40]. Erste exemplarische Untersuchungen von extrazellulären Matrixproteinen nach HHD-Behandlung bis 600 MPa geben Hinweise darauf, dass sich auch die biologische Wertigkeit des Knochens nach dieser Behandlungsmethode nicht wesentlich verändert [12].

HHD kann die Replikationsfähigkeit von eu- und prokaryontischen Zellen nachhaltig ausschalten. Deshalb stellt sich die Frage, ob das hydrostatische Hochdruckverfahren auch zur *Ex-vivo*-Sterilisation von aus Patienten entnommenen Knochen geeignet ist. Dabei soll der Druck möglichst so gewählt werden, dass Mikroorganismen in ihrer Replikationsfähigkeit gehindert, die mechanischen und biologischen Eigenschaften des Knochens und Knorpels aber nicht beeinträchtigt werden. Das so desinfizierte Gewebe könnte in den Patienten reimplantiert werden. Die Hochdruckbehandlung könnte somit eine neuartige Alternative zur Hitzesterilisation oder Sterilisation durch radioaktive Strahlung von Knochen oder anderen Geweben darstellen.

In der vorliegenden Arbeit wurde HHD erstmals als Verfahren zur Desinfektion von infizierten Osteitisknochen geprüft. Die Effektivität sollte sowohl an unbehandeltem Infektknochen als auch an Knochen mit einer hohen Bakterienlast geprüft werden.

Material und Methode

Gewinnung und HHD-Behandlung der Osteitisknochenproben

Sämtliche Knochenchips wurden von Patienten mit der Diagnose Osteitis oder infizierte Totalendoprothese im Rahmen des therapeutischen Débridements gewonnen. Es erfolgte keine zusätzliche Entnahme von Knochen für diese experimentelle Untersuchung, weshalb von den einzelnen Operationen auch unterschiedliche Probenmengen vorlagen. Patienteneinverständnis lag vor.

Hochdruckbehandlung

Versuchsaufbau und -durchführung Die Durchführung der Hochdruckbehandlung wurde bereits in früheren Arbeiten ausführlich beschrieben [9]. Zusammengefasst wurden die Proben in Nalgene® cryogenic vials (Nalge Company, Rochester, NY, USA) platziert, diese komplett mit steriler Ringerlösung gefüllt (Gesamtvolumen: 2,3 ml) und verschlossen. Die Kappe der Gefäße wurde zusätzlich mit Parafilm® (American National Can Company, Joplin, MO, USA) abgedichtet. Die Proben wurden dann in die in früheren Versuchen validierte Autoklavenkammer der Hochdruckmaschine (HDR 100-20, RECORD Maschinenbau GmbH, Königsee, Deutschland) gebracht. Zur Behandlung der Gewebe wurde der HHD mit verschiedenen Parametern wie Druckaufbau- und Druckabbaugeschwindigkeit, Druck-Plateaudauer, Wiederholungshäufigkeit und Temperatur je nach Zielsetzung vari-

iert. Druckauf- und Druckabbau erfolgten gleichmäßig innerhalb von 60 s. Der zu erzeugende Druck sowie die Temperatureinstellungen wurden manuell geregelt. Die Kontrollproben blieben unbehandelt.

Serie 1 Infizierte humane Knochenstückchen wurden sofort nach Entnahme in die Probengefäße eingefüllt und einer hydrostatischen Hochdruckbehandlung unterzogen. Als Druckstufen wurden 300, 450 oder 600 MPa gewählt, mit einer Druckhaltedauer von 10 min (Tabelle 1).

Serie 2 Aufgrund mikrobiologischer Unsicherheiten zum Infektstatus vor Behandlungsbeginn, mit negativem

Keimwachstum bei einzelnen Kontrollproben, wurden die Proben der Serie 2 vor der Druckapplikation bis zum sicheren Bakteriennachweis in Nährbouillon inkubiert, um die infizierenden Bakterien anzureichern. Hierzu wurden die gewonnenen Proben in trypticase soya-bouillon (TSB) für 5 Tage bei 37°C bebrütet. Durch Ausimpfen von Kontrollkulturen auf Blutagarplatten wurden die Proben auf positives Bakterienwachstum geprüft. Proben ohne Wachstum wurden von der weiteren Untersuchung ausgeschlossen.

Die anschließende HHD-Behandlung in Serie 2 erfolgte entweder mit einer Druckhaltezeit von 10 min (Tabelle 2), oder mit einer Druckhaltezeit von 2 × 30 min mit 30-minütiger Pause (Tabelle 3). Als Druckstufen wurden hier

Tabelle 1 HHD-Behandlung von Osteitisknochen ohne vorherige Bakterienanreicherung (Serie 1).

Keim	Druckstufe (MPa)	Gesamtanzahl der Proben (n)	Sterile Proben (n)	Sterile Proben (%)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Kontrolle (0)	2	0	0
	300	2	0	0
	450	2	0	0
	600	1	0	0
KNS	Kontrolle (0)	5	3	60
	300	3	3	100
	450	3	3	100
	600	3	3	100
<i>Escherichia coli</i>	Kontrolle (0)	1	0	0
	300	1	1	100
	450	1	1	100
	600	1	1	100
Total nach Druckstufen	Kontrolle (0)	8	3	38
	300	6	4	67
	450	6	4	67
	600	5	4	80
Total der HHD-behandelten Proben	Alle Druckstufen	17	12	71

Druckhaltezeit: 10 min; KNS, koagulase negative Staphylokokken.

Tabelle 2 HHD-Behandlung von Osteitisknochen mit vorheriger Bakterienanreicherung (Serie 2).

Keim	Druckstufe (MPa)	Gesamtanzahl der Proben (n)	Sterile Proben (n)	Sterile Proben (%)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Kontrolle (0)	16	0	0
	450	7	0	0
	600	17	1	6
KNS	Kontrolle (0)	7	0	0
	600	6	0	0
<i>S. aureus</i> + KNS	Kontrolle (0)	1	0	0
	600	3	0	0
<i>Escherichia coli</i>	Kontrolle (0)	1	0	0
	300	2	0	0
	600	2	1	50
Total nach Druckstufen	Kontrolle (0)	25	0	0
	300	2	0	0
	450	7	0	0
	600	28	2	7
Total der HHD-behandelten Proben	Alle Druckstufen	37	2	5

Druckhaltezeit: 10 min; KNS, koagulase negative Staphylokokken.

Tabelle 3 HHD-Behandlung von Osteitisknochen mit vorheriger Bakterienanreicherung (Serie 2).

Keim	Druckstufe (MPa)	Gesamtanzahl der Proben (n)	Sterile Proben (n)	Sterile Proben (%)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Kontrolle (0)	3	0	0
	600	8	1	13
KNS	Kontrolle (0)	3	0	0
	600	5	1	20
<i>S. aureus</i> + KNS	600	1	0	0
<i>S. aureus</i> + Enterokokken	Kontrolle (0)	1	0	0
	600	2	0	0
Enterokokken	Kontrolle (0)	1	0	0
	600	2	0	0
Total	Kontrolle (0)	8	0	0
	600	18	2	11

Druckhaltezeit: 2×30 min; KNS, koagulase negative Staphylokokken.

zunächst analog zur Serie 1 300, 450 oder 600 MPa gewählt. Da sich insbesondere bei den niedrigeren Druckstufen kein wesentlicher Sterilisationserfolg zeigte und gerade die beiden unteren Druckstufen insuffizient waren, wurde in der Folge nur noch die höchste Stufe mit 600 MPa gewählt. Dies ist auch vor dem Hintergrund der nur in begrenzter Menge vorliegenden und somit schwierig zu akquirierenden infizierten Knochenproben zu sehen.

Wenigstens eine Probe einer jeden Operation wurde nicht mit HHD behandelt und diente als Kontrolle. Nach der Behandlung wurden die Proben erneut für 5 Tage bei 37°C in TSB bebrütet. Anschließend erfolgten die weitere mikrobiologische Kultur zur Kontrolle des Keimwachstums und die Typisierung mittels mikrobiologischer Standardtechniken.

Beurteilung artifiziell kontaminierter Knochenproben unter dem Rasterelektronenmikroskop

Vorbereitung der Referenzkeime und Infektion des Knochens Zur besseren Standardisierung der rasterelektronenmikroskopischen Beurteilung erfolgte die Untersuchung an artifiziell infizierten Proben eines humanen Hüftknochens. Von diesem wurden Knochenstücke unter aseptischen Bedingungen mit einem scharfen Löffel präpariert. Für die Infektion des Knochens wurden folgende Referenzkeime der American Type Culture Collection (ATCC) benutzt: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *S. epidermidis* (ATCC 35984), *Enterococcus faecium* (ATCC 6057) und *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). Die beiden Staphylokokkenstämme wurden gewählt, weil sie als häufigste Erreger von Knochen- und Gelenkinfektionen gelten: *P. aeruginosa* als Modellkeim für gramnegative Keime und *E. faecium*, da dieser Keim aufgrund einer bekannten hohen Widerstandsfähigkeit gegen physikalische Einflüsse als Testkeim zur Prüfung von Desinfektionsautomaten eingesetzt wird [37]. Die Bakterienstämme waren bei -70°C gelagert. Nach 24 h in Müller-Hinton-II-Bouillon wurden sie nach einem Waschvorgang weitere 24 h in TSB bei 37°C bis zur endlogarithmischen Wachstumsphase angezüchtet. Sie wurden anschließend zweimal in Phosphatpuffer (PBS) gewaschen, abzentrifugiert und in physiologischer Ringer-Lösung resuspendiert. Schließlich wurde ihre

Konzentration mit Hilfe der MacFarland-Densometrie auf 10^5 koloniebildende Einheiten (KBE)/ml eingestellt.

Die Knochenstücke wurden dann in der Bakterien suspension für 24 h bei 37°C inkubiert, in die mit TSB gefüllten cryogenic vials umgebettet und mit hydrostatischem Hochdruck behandelt. Von den Knochenstücken wurden jeweils pro Keim zwei Proben HHD behandelt (600 MPa, Raumtemperatur, 10 min), zwei weitere unbehandelte Proben dienten als Kontrolle. Es wurde nur diese eine Druckstufe untersucht, da wir von den Ergebnissen der Osteitisknochen bereits gesehen hatten, dass niedrigere Druckstufen keinen nennenswerten antibakteriellen Effekt auf infizierte Knochenproben zeigten.

Durchführung der Rasterelektronenmikroskopie Die Knochenproben wurden nach HHD-Applikation und einem Waschgang mit PBS für 20 min in 2% Glutaraldehydlösung fixiert, mit Ringer-Lösung gespült und für eine Stunde mit 4% Osmiumtetroxid kontrastiert. Folgend wurden die Proben in einer aufsteigenden Alkoholreihe (30%, 50%, 70% und 100%) je 2×5 min entwässert und dann einer Hexamethyldisilazan-(HMDS)-Reihe (Ethanol trocken+HMDS 2:1, 1:1, 1:2 und reines HMDS), ebenfalls je 2×5 min, zugeführt. Die weitere Trocknung der Proben erfolgte über Nacht durch Lagerung auf Kieselsteinen. Nach dem Trocknen wurden die Proben mit doppelseitig klebenden Folien (Leit-Tabs, Plano G3347, Plano, Marburg, Deutschland) auf den Probetellern befestigt. Mit einem Sputtergerät (SCD 050; Balzers, Liechtenstein) erfolgte schließlich die Beschichtung der Proben mit einer ca. 10 nm dünnen Goldschicht. Zur Untersuchung diente ein Rasterelektronenmikroskop JSM 6300 (JEOL, Tokio, Japan).

Die statistische Auswertung wurde mit der SPSS-Software durchgeführt (SPSS, Chicago, IL, USA). Wir benutzten den Z-Test, wobei ein p-Wert <0,05 als statistisch signifikant angesehen wurde.

Ergebnisse

HHD-Behandlung von Osteitisknochenproben

Serie 1: ohne vorherige Bakterienanreicherung Insgesamt wurden 25 Proben von 4 verschiedenen Patienten

ten (4 Operationen) gewonnen. 8 dieser Proben dienten als Kontrolle, 17 Proben wurden einer HHD-Behandlung zugeführt (Druckstufen siehe Tabelle 1). Nach Hochdruckapplikation zeigte sich eine komplette Sterilisation bei 12 der insgesamt 17 behandelten Proben (71%). Die unbehandelten Kontrollen zeigten bei 3 von 8 Proben (38%) kein bakterielles Wachstum (Tabelle 1). Vergleicht man die Sterilisationsraten aller HHD-behandelten und unbehandelten Proben der Serie 1, so zeigte sich kein signifikanter Unterschied ($p=0,256$).

Die Sterilisationsraten der verschiedenen Bakterienpezies sind ebenfalls in Tabelle 1 aufgeführt. Während *Staphylococcus epidermidis* und *Escherichia coli* erfolgreich eradiziert wurden, persistierte *S. aureus* bei allen Druckstufen.

Serie 2: mit vorheriger Bakterianreicherung; Druckhaltdauer 10 min Es wurden 71 Proben von 14 Patienten aus 21 verschiedenen Operationen gewonnen und in Nährlösung inkubiert. 9 Proben zeigten kein Bakterienwachstum, diese wurden vor der Hochdruckbehandlung verworfen. 37 der 62 verbliebenen Proben mit positivem Bakterienwachstum wurden über 10 min mit bis zu 600 MPa behandelt, 25 Proben dienten als unbehandelte Kontrolle (Tabelle 2).

Insgesamt konnten 2 der 37 Proben sterilisiert werden (5%), alle Kontrollen (100%) waren positiv. Weder bei 300 MPa noch bei 450 MPa konnte eine erfolgreiche Sterilisation nach Anreicherung erreicht werden. Erst bei 600 MPa konnte in 2 von 28 Fällen (7%) eine Sterilisation erreicht werden (Tabelle 2). Der Unterschied im Vergleich zu den 25 bewachsenen Kontrollen war statistisch nicht signifikant ($p=0,708$, Z-Test). Die Druckstufen 300 und 450 MPa wurden im Laufe der Untersuchungen nicht mehr fortgeführt, da sich hier, wie bereits oben erwähnt, nur ein geringer Sterilisationserfolg zeigte. In der Folge wurde nur noch die höchste Druckstufe von 600 MPa untersucht.

Serie 2: mit vorheriger Bakterianreicherung; Druckhaltdauer 2 x 30 min Für dieses Behandlungsprotokoll wurden 54 Proben von 16 Patienten in 25 Operationen gewonnen. 28 Proben zeigten bei Inkubation kein Bakterienwachstum und wurden vor der Behandlung verworfen. Von den 26 Proben mit positivem Keimwachstum wurden 18 über 2 Intervalle à 30 min mit einem HHD von 600 MPa behandelt, 8 Knochenproben dienten als unbehandelte Kontrolle.

Es zeigte sich bei 2 von 18 Proben eine erfolgreiche Sterilisation (11%), alle Kontrollproben waren positiv (100%) ($p=0,861$, Z-Test). Enterokokken erwiesen sich als besonders druckresistent (Tabelle 3).

Fasst man die Ergebnisse der Serie 2 nach vorheriger Anreicherung der Bakterien zusammen, so zeigte sich im Total (Druckhaltezeit 10 min und 2 x 30 min): bei den Kontrollen: 0/32 steril, bei den Proben mit 600 MPa: 4/46 = 8,7% steril, $p=0,234$, Z-Test.

Bei den Untersuchungen der Serie 2 zeigten sich mit beiden Druckhaltezeiten eine später auftretende und insgesamt deutlich geringere Trübung des Nährmediums bei den behandelten Proben im Gegensatz zu den nicht behandelten Proben. Dies wurde als indirektes Zeichen eines verminderten und verlangsamten Bakterienzell-

wachstums interpretiert. Die Wachstumsgeschwindigkeit der behandelten Bakterien wurde jedoch nicht weiter quantifiziert.

Rasterelektronenmikroskopische Darstellung HHD-behandelter Bakterien

***Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *S. epidermidis* ATCC 35984, *Escherichia faecium* ATCC 6057** Die unbehandelten Kontrollproben aller drei Spezies zeigten die für sie typische kokkenförmige Morphologie mit glatter, intakter Membran. Die HHD-behandelten Proben der grampositiven Kokken zeigten ebenfalls zum weit überwiegenden Teil eine intakte Morphologie, nur sehr vereinzelt waren Deformierungen der Oberfläche zu beobachten. Diese Veränderungen traten in der gesamten Zellpopulation nur sporadisch auf. Insgesamt waren also kaum morphologische Veränderungen zu registrieren, welche bei der gegebenen REM-Auflösung aufgezeigt werden konnten (Abbildung 1).

***Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853** Die unbehandelten Proben zeigten *P. aeruginosa* stäbchenförmig mit intakter, glatter Zelloberfläche. Bei den behandelten Proben von *P. aeruginosa* zeigte sich zunächst auf den Übersichtsaufnahmen eine erhebliche Reduktion der Keimzahl bei den HHD-behandelten Proben (Abbildung 2A,C). Deutliche Veränderungen der Morphologie waren bei der gesamten Zellpopulation zu beobachten: Die Bakterienzellen waren deformiert mit großen Löchern und Einziehungen in den alterierten Zellwänden (Abbildung 2B,D).

Diskussion

Die gravierendste Komplikation der allogenen Knochen transplantation ist die Übertragung von Keimen mit folgender Infektion beim Empfänger [18, 26, 31]. Der Einsatz von Desinfektionsverfahren wird gefordert. Sämtliche etablierte Verfahren kompromittieren jedoch die biologischen und/oder mechanischen Eigenschaften des Knochens.

HHD wird zur Haltbarmachung von Lebensmitteln eingesetzt [17, 19, 29] und wurde von unserer Arbeitsgruppe mit Erfolg zur Abtötung von Tumorzellen untersucht [11]. Zum Effekt des HHD auf infiziertes Knochengewebe liegen jedoch bisher noch keine Daten vor. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Effektivität von HHD in der Desinfektion von infiziertem Knochen.

Allgemeine biologische Wirkung von HHD

Wasser nimmt bei der Wirkung von Hochdruck auf andere Moleküle eine wichtige Schlüsselrolle ein, da es durch seine Dichteverariationsbreite sehr empfänglich für Druckveränderungen ist. Unter steigendem Druck dringt Wasser in atomare Hohlräume komplexer Makromoleküle ein und kann so ihre Quartär- und Tertiärstruktur sprengen [30]. Das erklärt indirekt auch, warum Bakteriensporen in Abwesenheit von Wasser bis 1000 MPa druckresistent sind [8, 33]. Kovalente Bindungen scheinen allerdings von HHD unbeeinflusst zu bleiben [29]. Druck breitet sich gleichmäßig und konstant in allen Geweben aus. Die Zellmembranen, das Zytoskelett und die Enzymsysteme

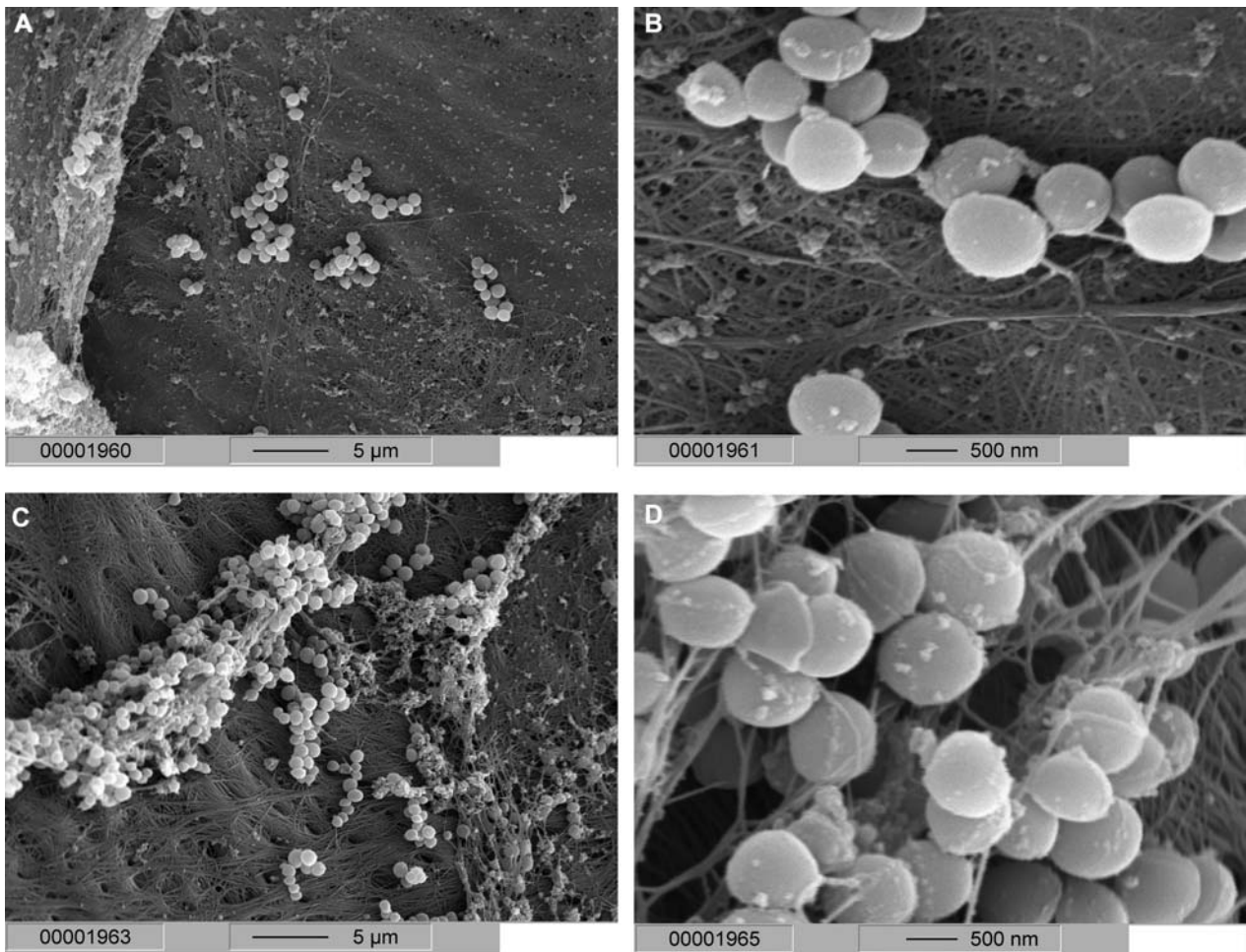


Abbildung 1 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von *Staphylococcus aureus* im Knochen. (A) Kontrolle, 3.000 \times . (B) Kontrolle, 20.000 \times . (C) Nach HHD-Behandlung (600 MPa; 10 min), 3.000 \times . (D) Nach HHD-Behandlung (600 MPa; 10 min), 20.000 \times . Die Oberflächenstruktur der Keime blieb nach HHD-Behandlung unverändert.

können durch Hochdruckbehandlung nachhaltig alteriert bzw. vollständig zerstört werden, was wiederum zum Absterben des Mikroorganismus führt [3, 7, 15].

Wechselwirkungen des HHD mit Knochen, Knorpel und Sehnen

In vorausgehenden Arbeiten wurden erstmalig die biomechanischen und immunhistochemischen Eigenschaften von Knochen, Gelenkknorpel und Sehnen nach HHD-Behandlung untersucht. Dabei konnten selbst bei einer Behandlung mit sehr hohen Druckstufen bis 600 MPa (10 min; 37°C), im Gegensatz zu thermischen Behandlungen, keine wesentlichen Veränderungen der biomechanischen Eigenschaften festgestellt werden [9, 13, 24, 39, 40]. Auch die Bestrahlung von Allografts führt bei der empfohlenen Strahlendosis von 25–35 kGy zu einer Reduktion der biomechanischen Parameter auf 61–69% ihres Ausgangswertes [24].

Weiterhin bleiben die biologischen Eigenschaften von extrazellulären Matrixproteinen wie Fibronectin (FN), Vitronectin (VN) und Kollagen I (Kol-I) nach HHD-Behandlung bis 600 MPa erhalten [12]. Diese Proteine, wichtig für die Knochenbiologie und auch für die Osteointegration von Knochen, zeigten im Vergleich zu unbehandeltem Protein keine verminderte Aktivität hinsichtlich ihrer

Effekte auf Adhäsion, „Spreading“ und Proliferation von primären humanen Osteoblasten. Diese ersten Ergebnisse geben Hinweise darauf, dass mit HHD, im Gegensatz zu Bestrahlung und Autoklavierung, ein biologisch hochwertigeres Knochensegment erhalten werden kann, welches bezüglich Einheilung und Spontanfrakturen eine geringere Komplikationsrate erwarten lässt.

Antimikrobielle Effekte von HHD

Der wichtigste Ort der druckinduzierten Schäden bei Mikroorganismen sind Membransysteme wie die Bakterienzellwand [20, 34]. Erfahrungen aus der Lebensmitteltechnologie haben gezeigt, dass sich Mikroorganismen in Suspension mit HHD keimabhängig bereits ab 200 MPa bei Raumtemperatur abtöten lassen [6, 14]. Auch wir konnten diese Ergebnisse mit typischen Erregern von Knocheninfektionen bestätigen [Gollwitzer H, Diehl P, Brendle M, Weber P, Miethke T, Hofman GO, Gerdsmeyer L, Schauwecker J, Mittelmeier W, unpublizierte Daten]. In den bisherigen Untersuchungen der Lebensmitteltechnologie konnte ferner gezeigt werden, dass Hefen bereits bei niedrigen Druckstufen irreversibel geschädigt werden, während für grampositive Bakterien Druckstufen von 600 MPa und höher zur Inaktivierung notwendig sind [1, 2, 38]. Hinsichtlich ihrer Druckresis-

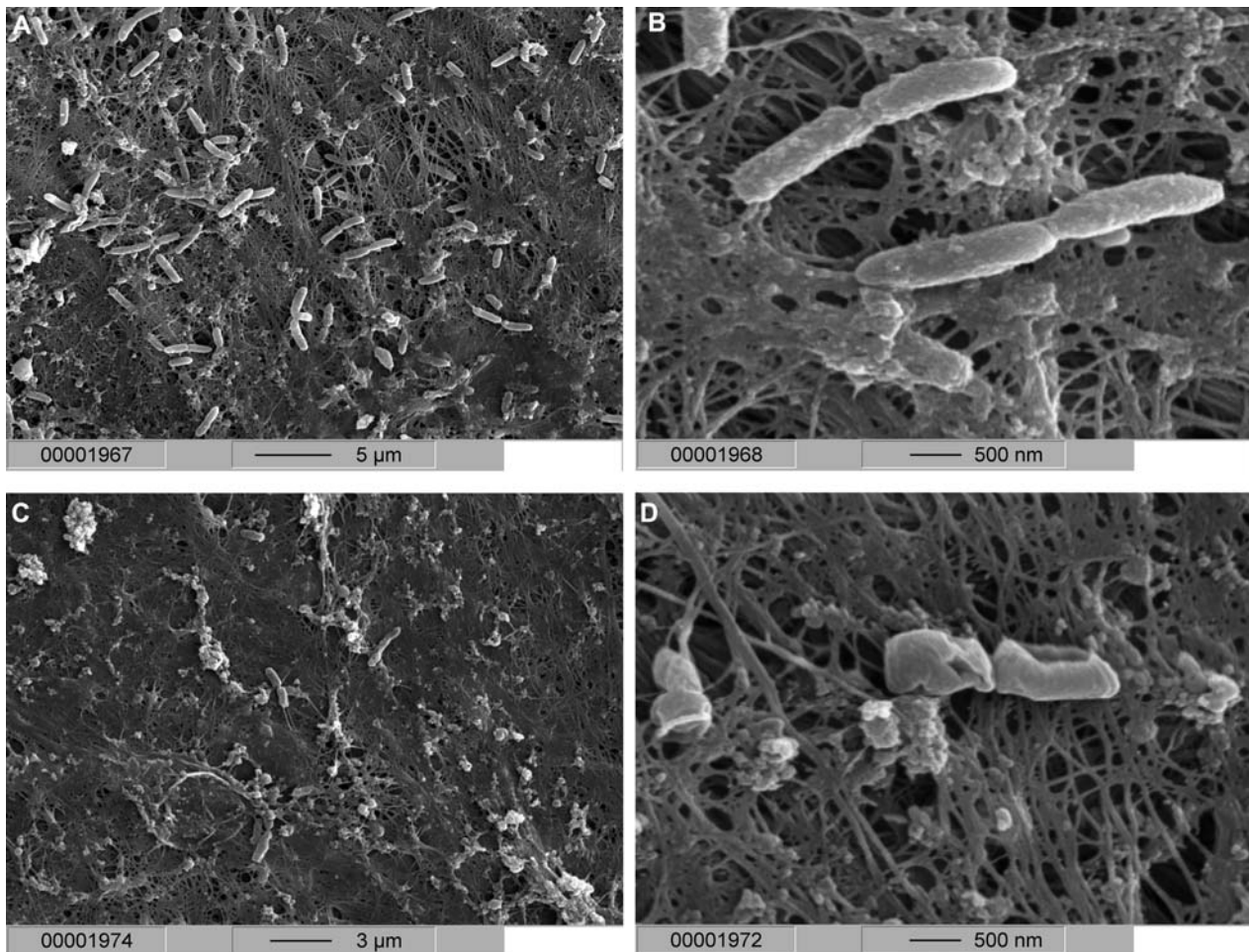


Abbildung 2 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von *Pseudomonas aeruginosa* im Knochen.

(A) Kontrolle, 3.000 \times . (B) Kontrolle, 20.000 \times . (C) Nach HHD-Behandlung (600 MPa; 10 min), 4.000 \times . (D) Nach HHD-Behandlung (600 MPa; 10 min), 20.000 \times . Auf den Übersichtsvergrößerungen sieht man eine deutliche Reduktion der Bakteriendichte durch die HHD-Behandlung. Die behandelten Bakterien waren komplett deformiert mit großen Löchern und Einziehungen der Oberflächen.

tenz ist unter den Mikroorganismen jedoch eine große Variabilität zu beobachten [1, 6, 16].

In der vorliegenden Arbeit wurde nun erstmals die Effektivität des HHD zur Desinfektion von infiziertem Gewebe am Beispiel chronisch infizierter humaner Knochenchips untersucht. Wurde der Knochen direkt nach Explantation mit HHD behandelt (Serie 1), so konnten 71% der Knochenchips sterilisiert werden. Sämtliche Proben mit gramnegativen Keimen zeigten nach HHD-Applikation kein Bakterienwachstum mehr. Da jedoch auch einige unbehandelte Kontrollproben kein Bakterienwachstum zeigten, gab es Unsicherheiten zum Infektionsstatus der Knochenproben vor Hochdruckapplikation. Auch könnte ein falsch-negativer Befund durch eine – nicht ausreichende – Inkubation über 5 Tage bedingt gewesen sein. Folglich wurden die infizierten Knochen vor HHD-Behandlung in Nährmedium inkubiert, und nur Proben mit positivem Keimnachweis wurden für die weiteren Experimente der Serie 2 verwendet.

Durch die vorherige Anreicherung der Bakterien in den Knochenbiopsien zeigten sämtliche Kontrollproben positives Bakterienwachstum, so dass Unsicherheiten zum Infektstatus ausgeschlossen werden konnten. Hierdurch wurde für das HHD-Verfahren jedoch auch ein „worst-case“-Szenarium geschaffen: Die zu behandelnden Kno-

chenproben hatten nach der Bebrütung eine extrem hohe Bakterienlast. Zudem waren die Bakterien nach 5-tägiger Inkubation in einer stationären Wachstumsphase, in welcher Bakterien als weniger barosensitiv gelten [28]. Die Sterilisationsrate lag somit auch bei 600 MPa nurmehr zwischen 7% und 11%.

Statistisch signifikante Unterschiede in den Desinfektionsraten waren nicht zu beobachten, was vor allem durch die relativ kleine Fallzahl begründet ist. Die statistische Auswertung erfolgte als deskriptive Statistik, da in der klinischen Anwendung Desinfektionsraten von annähernd 100% erreicht werden sollten und somit kleinere – auch statistisch signifikante Unterschiede – keine klinische Relevanz besitzen. Die HHD-behandelten Knochenproben zeigten ferner im Vergleich zu den unbehandelten Proben ein deutlich verlangsamtes und reduziertes Bakterienwachstum, was durch die verlangsamte und verminderte Trübung der Suspensionen gezeigt wurde, auch wenn die Wachstumsgeschwindigkeit von uns nicht weiter quantifiziert wurde.

In der klinischen Anwendung sind für das Verfahren aufgrund der geringeren Keimlast deutlich höhere Sterilisationsraten zu erwarten, was auch die wesentlich besseren Inaktivierungsergebnisse aus den Versuchen der Serie 1 ohne vorherige Anreicherung zeigten (Sterilisa-

tionsrate von 71% bei sämtlichen Druckstufen). Dennoch ist die Effektivität für einen klinischen Einsatz als Knochen-desinfektionsverfahren bei weitem noch nicht ausreichend und muss wesentlich verbessert werden. So könnten die Temperatur während der Behandlung, die Zugabe von adjuvanten Substanzen zum Behandlungsmedium, Druckaufbau- und Druckabbaugeschwindigkeit oder noch höhere Druckstufen eine Verbesserung bringen [2, 6, 27]. Aus technischen Gründen ist Hochdruckapplikation mit Stärken über 600 MPa jedoch aufwendig. Auch liegen noch keine Ergebnisse für die Biomechanik bei diesen höheren Druckstufen vor. Kein Sterilisationserfolg zeigte sich bei den beiden niedrigeren Druckstufen von 300 und 450 MPa (jeweils bei 10 min und 30 min Druckhaltezeit), so dass diese Druckstufen in der Behandlung von infiziertem Knochen keine weitere Rolle spielen dürften. Wie schon in der Literatur beschrieben, führte auch bei unseren Experimenten eine Verlängerung der Behandlungsdauer zu keiner wesentlichen Verbesserung der Ergebnisse [2, 21, 32].

Im Vergleich zu den bisher eingesetzten Sterilisationsverfahren der Autoklavierung und Bestrahlung besitzt HHD-behandelter Knochen eine deutlich bessere biologische und mechanische Qualität [40, 41]. Bestrahlter Knochen zeigt nur noch eine rein osteokonduktive Potenz, ist jedoch frei von Keimen [41], und wärmebehandelter Knochen verliert deutlich an biomechanischer Stabilität [36]. Unserer Versuche konnten eine deutliche Keimreduktion sowie in vielen Fällen auch eine komplette Desinfektion nachweisen, führten jedoch nicht mit ausreichender Sicherheit zur Keimfreiheit, so dass bis zum klinischen Einsatz von HHD eine weitere Optimierung des Verfahrens notwendig wird.

Morphologische Veränderungen grampositiver und gramnegativer Bakterien durch HHD-Behandlung

Für gramnegative Bakterien wurde in flüssigen Medien eine deutlich geringere Barotoleranz als für grampositive Bakterien beschrieben [2, 27, 38, 42]. Ein entsprechendes Verhalten gegenüber HHD zeigte sich auch in unseren Versuchen mit Osteitisknochen. Diese Beobachtungen bestätigten sich in den morphologischen REM-Untersuchungen HHD-behandelter infizierter Knochenproben. Hier zeigte sich eine regelmäßige Zerstörung der bakteriellen Zellwand und Alteration der Oberflächenmorphologie gramnegativer Stäbchen, wohingegen die grampositiven Bakterien nur vereinzelt morphologische Oberflächenveränderungen aufwiesen. Die höhere Drucksensibilität der gramnegativen Stäbchen lässt sich einerseits durch den einfacheren Aufbau der Zellwand erklären, andererseits besteht durch die Stäbchenform eine ungünstigere Form als bei den druckresistenten kugelförmigen Kokken. Unsere Ergebnisse bestätigen auch die beschriebenen mechanisch destruktiven Effekte des Hochdrucks auf Membransysteme mit morphologischer Veränderung und Destruktion der Bakterienoberfläche [20, 34].

Schlussfolgerung

Die vorliegenden Untersuchungen konnten zeigen, dass die HHD-Behandlung ein brauchbares Verfahren zur Des-

infektion infizierter Knochenproben darstellt, welches jedoch eine weitere Optimierung erfordert. Den gestellten Anforderungen konnte die Technologie des HHD bei der Sterilisation von Knochen bei gramnegativen Bakterien am ehesten gerecht werden, bei grampositiven Bakterien war die beobachtete Inaktivierung unzureichend.

Eine mögliche Indikation des HHD könnte in der Therapie der chronischen Osteitis bei Nachweis einer Monoinfektion mit barosensiblen, gramnegativen Stäbchen oder Hefen liegen. Ähnlich wie bei der extrakorporalen Tumordevitalisation [4, 5] könnte der infizierte Knochen bei komplexen und langwierigen Osteitisverläufen explantiert, *ex vivo* mit HHD behandelt und im gleichen Eingriff wieder reimplantiert werden. Mit einer weiteren Modifikation der Behandlungsparameter (Intervallbehandlung, Behandlungsdauer, Temperatur, Behandlungsmedium, Druckaufbau- und Druckabbaugeschwindigkeit) könnte die Effektivität des HHD nochmals erhöht werden, um auch eine Desinfektionsbehandlung zur Erhöhung der Sicherheit allogener Transplantate zu realisieren.

Danksagung

Diese Arbeit wurde vom Bayerischen Ministerium für Wissenschaft, Kultur und Bildung (Bayerische Forschungsstiftung, Bayerischer Forschungsverbund für Tissue Engineering und Rapid Prototyping FORTEPRO, Teilprojekt TE3) unterstützt. Wir danken Dr. G. Blümelhuber vom Lehrstuhl für Energie- und Umwelttechnik der Lebensmittelindustrie, Technische Universität München (Direktor: Prof. Dr. R. Meyer-Pittroff) für die technische Unterstützung.

Literatur

- [1] Alpas H, Kalchayanand N, Bozoglou F, Sikes A, Dunne CP, Ray B. Variation in resistance to hydrostatic pressure among strains of food-borne pathogens. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65: 4248–4251.
- [2] Arroyo G, Sanz PD, Prestamo G. Effect of high pressure on the reduction of microbial populations in vegetables. *J Appl Microbiol* 1997; 82: 735–742.
- [3] Balny C, Masson P, Heremans K. High pressure effects on biological macromolecules: from structural changes to alteration of cellular processes. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1595: 3–10.
- [4] Bohm P, Fritz J, Thiede S, Budach W. Reimplantation of extracorporeal irradiated bone segments in musculoskeletal tumor surgery: clinical experience in eight patients and review of the literature. *Langenbecks Arch Surg* 2003; 387: 355–365.
- [5] Bohm P, Springfield R, Springer H. Re-implantation of autoclaved bone segments in musculoskeletal tumor surgery. Clinical experience in 9 patients followed for 1.1–8.4 years and review of the literature. *Arch Orthop Trauma Surg* 1998; 118: 57–65.
- [6] Cheftel JC. High pressure, microbial inactivation and food preservation. *Food Sci Technol Int* 1995; 1: 75–90.
- [7] Crenshaw HC, Salmon ED. Hydrostatic pressure to 400 atm does not induce changes in the cytosolic concentration of Ca²⁺ in mouse fibroblasts: measurements using fura-2 fluorescence. *Exp Cell Res* 1996; 227: 277–284.
- [8] Delacour H, Clery C, Masson P, Vidal DR. Inactivation of bacterial spores by high hydrostatic pressure. *Ann Pharm Fr* 2002; 60: 38–43.

- [9] Diehl P, Naal FD, Schauwecker J, et al. Biomechanical properties of articular cartilage after high hydrostatic pressure treatment. *Biomed Tech (Berl)* 2006; 51: 8–14.
- [10] Diehl P, Reuning U, Gollwitzer H, et al. Effect of extracorporal high hydrostatic pressure on tumor cell adherence and viability. *Oncol Rep* 2004; 12: 369–373.
- [11] Diehl P, Schmitt M, Blumelhuber G, et al. Induction of tumor cell death by high hydrostatic pressure as a novel supporting technique in orthopedic surgery. *Oncol Rep* 2003; 10: 1851–1855.
- [12] Diehl P, Schmitt M, Schauwecker J, et al. Effect of high hydrostatic pressure on osteoinductive properties of extracellular bone matrix proteins. In *J Mol Med* 2005; 16: 285–289.
- [13] Diehl P, Steinhauser E, Gollwitzer H, et al. Biomechanical and immunohistochemical analysis of high hydrostatic pressure-treated Achilles tendons. *J Orthop Sci* 2006; 11: 380–385.
- [14] Gould GW, Abee T, Granum PE, Jones MV. Physiology of food poisoning microorganisms and the major problems in food poisoning control. *Int J Food Microbiol* 1995; 28: 121–128.
- [15] Gross M, Jaenicke R. Proteins under pressure. The influence of high hydrostatic pressure on structure, function and assembly of proteins and protein complexes. *Eur J Biochem* 1994; 221: 617–630.
- [16] Hauben KJ, Bartlett DH, Soontjens CC, Cornelis K, Wuytack EY, Michiels CW. *Escherichia coli* mutants resistant to inactivation by high hydrostatic pressure. *Appl Environ Microbiol* 1997; 63: 945–950.
- [17] Hayashi Rikimaru. An overview of the use of high pressure in bioscience and biotechnology. In: Hayashi R, Balny C, editors. *High pressure bioscience and biotechnology*. Amsterdam: Elsevier Science 1996: 1–6.
- [18] Hofmann GO, Kirschner MH, Wangemann T, Falk C, Mempel W, Hammer C. Infections and immunological hazards of allogeneic bone transplantation. *Arch Orthop Trauma Surg* 1995; 114: 159–166.
- [19] Hoover DG. Pressure effects on biological systems. *Food Technol* 1993; 47: 150–155.
- [20] Hoover DG, Metrick C, Papineau AM, Farkas DF, Knorr D. Biological effects of high hydrostatic pressure on food microorganisms. *Food Technol* 1989; 43: 99–107.
- [21] Kalchayanand N, Sikes A, Dunne CP, Ray B. Factors influencing death and injury of foodborne pathogens by hydrostatic pressure-pasteurization. *Food Microbiol* 1998; 15: 207–214.
- [22] Knaepler H, v.Garrel T, Gotzen L. Untersuchungen zur Desinfektion und Sterilisation allogener Knochentransplantate. *Der Unfallchirurg (Beihefte)* 1994; 235: 1–101.
- [23] Knaepler H, v.Garrel T, Gurtler L. Die allogene Knochen transplantation – eine aktuelle Standortbestimmung. *Deutsch Arztebl* 1994; 91: B-798–B-802.
- [24] Knaepler H, Ascherl R, von Garrel T, Gotzen L. Guidelines for allogeneic bone transplantation. *Chirurg* 1991; 62: 763–765.
- [25] Kohler P, Kreicbergs A, Stromberg L. Physical properties of autoclaved bone. Torsion test of rabbit diaphyseal bone. *Acta Orthop Scand* 1986; 57: 141–145.
- [26] Lord CF, Gebhardt MC, Tomford WW, Mankin HJ. Infection in bone allografts. Incidence, nature, and treatment. *J Bone Joint Surg Am* 1988; 70: 369–376.
- [27] Ludwig H. Effects of high pressure on bacteria and fungi. In: Winter R, editor. *Advances in high pressure bioscience and biotechnology II*. Berlin/Heidelberg/New York: Springer 2002: 259–265.
- [28] Mackey BM, Forestière K, Isaacs N. Factors affecting the resistance of *Listeria monocytogenes* to high hydrostatic pressure. *Food Biotechnol* 1995; 9: 1–11.
- [29] Masson P, Tonello C, Balny C. High-pressure biotechnology in medicine and pharmaceutical science. *J Biomed Biotechnol* 2001; 1: 85–88.
- [30] Mentre P, Hui Bon HG. Effects of high hydrostatic pressures on living cells: a consequence of the properties of macromolecules and macromolecule-associated water. *Int Rev Cytol* 2001; 201: 1–84.
- [31] Norman-Taylor FH, Villar RN. Bone allograft: a cause for concern? *J Bone Joint Surg Br* 1997; 79: 178–180.
- [32] O'Reilly CE, O'Connor PM, Kelly AL, Beresford TP, Murphy PM. Use of hydrostatic pressure for inactivation of microbial contaminants in cheese. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66: 4890–4896.
- [33] Oh S, Moon MJ. Inactivation of *Bacillus cereus* spores by high hydrostatic pressure at different temperatures. *J Food Prot* 2003; 66: 599–603.
- [34] Perrier-Cornet JM, Hayert M, Gervais P. Yeast cell mortality related to a high-pressure shift: occurrence of cell membrane permeabilization. *J Appl Microbiol* 1999; 87: 1–7.
- [35] Pruss A, Baumann B, Seibold M, et al. Validation of the sterilization procedure of allogeneic avital bone transplants using peracetic acid-ethanol. *Biologicals* 2001; 29: 59–66.
- [36] Pruss A, Seibold M, Benedix F, et al. Validation of the „Marburg bone bank system“ for thermomodification of allogenic femoral head transplants using selected bacteria, fungi, and spores. *Biologicals* 2003; 31: 287–294.
- [37] Robert Koch-Institut des Bundesgesundheitsamtes. Richtlinie des Bundesgesundheitsamtes zur Prüfung von thermischen Desinfektionsverfahren in Reinigungsautomaten. *Bundesgesundheitsblatt* 1980; 23: 364–367.
- [38] Shigehisa T, Ohmori T, Saito A, Taji S, Hayashi R. Effects of high hydrostatic pressure on characteristics of pork slurries and inactivation of microorganisms associated with meat and meat products. *Int J Food Microbiol* 1991; 12: 207–215.
- [39] Shimizu K, Masumi S, Yano H, Fukunaga T, Ikebe S, Shin S. Revascularization and new bone formation in heat-treated bone grafts. *Arch Orthop Trauma Surg* 1999; 119: 57–61.
- [40] Steinhauser E, Diehl P, Hadaller M, et al. Biomechanical investigation of the effect of high hydrostatic pressure treatment on the mechanical properties of human bone. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2006; 76: 130–135.
- [41] von Garrel T, Gotzen L. Allogene Knochen transplantation und Knochenbanking. *Unfallchirurg* 1998; 101: 713–727.
- [42] Wuytack EY, Diels AM, Michiels CW. Bacterial inactivation by high-pressure homogenisation and high hydrostatic pressure. *Int J Food Microbiol* 2002; 77: 205–212.

Eingereicht: 6. Juli 2007; akzeptiert: 22. Mai 2008; online first: 21. Juli 2008