

Die Verkeimung von Spendergewebe zur Keratoplastik

J. Garweg, M. Böhnke und J. Draeger

Universitäts-Augenklinik, Hamburg (Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. J. Draeger), Bundesrepublik Deutschland

Zusammenfassung. Wir untersuchten 2885 Proben von Organkulturen humaner Korneoskleralscheiben hinsichtlich der Verkeimung der Gewebe. In 1054 ersten Waschlösungen nach der Präparation gelang ein Keimnachweis in 118 Fällen, in fünf Fällen überlebten unter der von uns verwendeten Antibiotika-Kombination Penicillin G, Streptomycin und Amphotericin B die Keime. Ein Maximum der Verkeimungshäufigkeiten fanden wir für die Monate April und Mai. Nach unseren Ergebnissen ist eine mindestens fünftägige Gewebekultur in ausreichenden Kulturvolumina erforderlich zum sicheren Ausschluß mikrobieller Kontamination. Auf Gentamycin in Kulturlösungen sollte bei zunehmender Resistenzentwicklung insbesondere bei Staphylokokken der Sicherheit des klinischen Einsatzes wegen verzichtet werden.

Schlüsselwörter: Hornhaut-Organkultur, Nährmedium, Verkeimung, mikrobielle Kontamination, Antibiotika-Resistenz, Gentamycin.

Microbial contamination of organ cultured corneal grafts

Summary. In an investigation with 2885 samples of organ culture fluid of human corneal tissue over seven years we found microbial growth in 118 cases in the primary washing solution after dissection. In five cases bacteria were able to survive under an antibiotic combination of penicillin G, streptomycin and amphotericin B. The highest incidence of microbial growth was found in the months of April and May. After our results there has to be an at least five-days period of tissue culture in reasonable culture volumina to exclude microbial contamination. Generally, gentamycin should not any more be used for organ culture with respect to the increasing numbers of gentamycin-resistant strains especially of staphylococcus species to provide a loss of security in the clinical use with a risk of slightly higher contamination rates.

Key words: Corneal tissues, organ culture solution, microbial contamination, antibiotic resistance, gentamycin.

Einleitung

Von einer deutlichen Zunahme der Keimbesiedelung und Keimdichte im Bereich von Konjunktiva und Tränenwegen nach dem Tod muß bei der Organentnahme zur Gewinnung

humaner Hornhauttransplantate ausgegangen werden [2, 4, 11, 12, 13, 16]. Auch wenn die Präparation unter sterilen Bedingungen erfolgt, ist somit eine Organverkeimung vorzusetzen [5, 7, 14]. Die Effizienz der deshalb vor Präparation der Korneoskleralscheibe durchgeführten Desinfektionsmaßnahmen läßt sich leicht durch Keimanzüchtung aus der ersten Immersionslösung der Korneoskleralscheibe nach der Präparation feststellen [3, 15].

Das zu erwartende Keimspektrum ist aus Konjunktivalabstrichen vor der Bulbusentnahme bekannt [6, 15] und wird zusätzlich zu den Desinfektionsmaßnahmen vor Präparation weitgehend durch die in der Kulturlösung enthaltenen Antibiotika abgedeckt.

Im folgenden möchten wir die klinischen und mikrobiologischen Ergebnisse der Hornhaut-Organkulturen von der zunächst experimentellen Phase 1981-1983 bis heute an unserer Klinik darstellen und anhand der Ergebnisse Möglichkeiten zur Qualitätssicherung diskutieren.

Material und Methoden

Unser Spenderkollektiv umfaßt zum kleineren Teil Organspender, die in der Regel infolge eines internistischen oder traumabedingten Akutereignisses verstorben sind. Zum größeren Teil handelt es sich um ein gerichtsmedizinisches Spender-Kollektiv. Das mittlere Lebensalter der Spender lag bei 44,7 Jahren, die mittlere Organentnahmezeit post mortem betrug 19,6 (1-96) Stunden.

Nach der Bulbusinspektion und vor der Bulbusentnahme wird Chloramphenicol- und Natamycin enthaltende Augensalbe in den Konjunktivalsack eingebracht, dieser vor Bulbusentnahme zusätzlich mit Azidamphenicol gespült. Die Organentnahme und Präparation der Korneoskleralscheibe erfolgen unter sterilen Bedingungen. Vor der Präparation wird der gesamte von der Adnexe befreite Bulbus 90 Sekunden in einer zweiprozentigen Polyvinylpyrrolidon-Jod-Lösung gebadet. Nach der Präparation wird die Korneoskleralscheibe in die Kulturlösung überführt. Diese entspricht **MEM** mit einem zweiprozentigen Zusatz von fetalem Kälber-Serum (FCS) und enthält die Antibiotika Penicillin G (Konzentration 0,1 mg des Na-Salzes pro ml) und Streptomycin (Konzentration 0,1 mg/ml) sowie das Antimykotikum Amphotericin B (Konzentration 2,5 µg/ml) sowie das Antimykotikum Amphotericin B (Konzentration 2,5 µg/ml). Die Untersuchung in einer spielemikroskopischen Untersuchung in einer

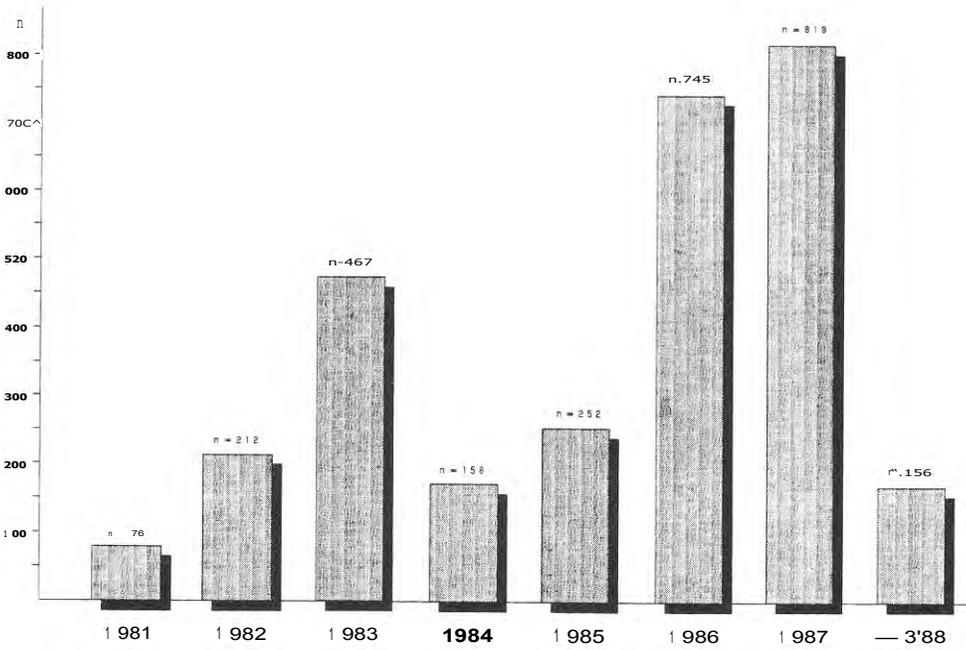


Abb. 1. Anzahl durchgeführter Keimanzüchtungen 1981-1988

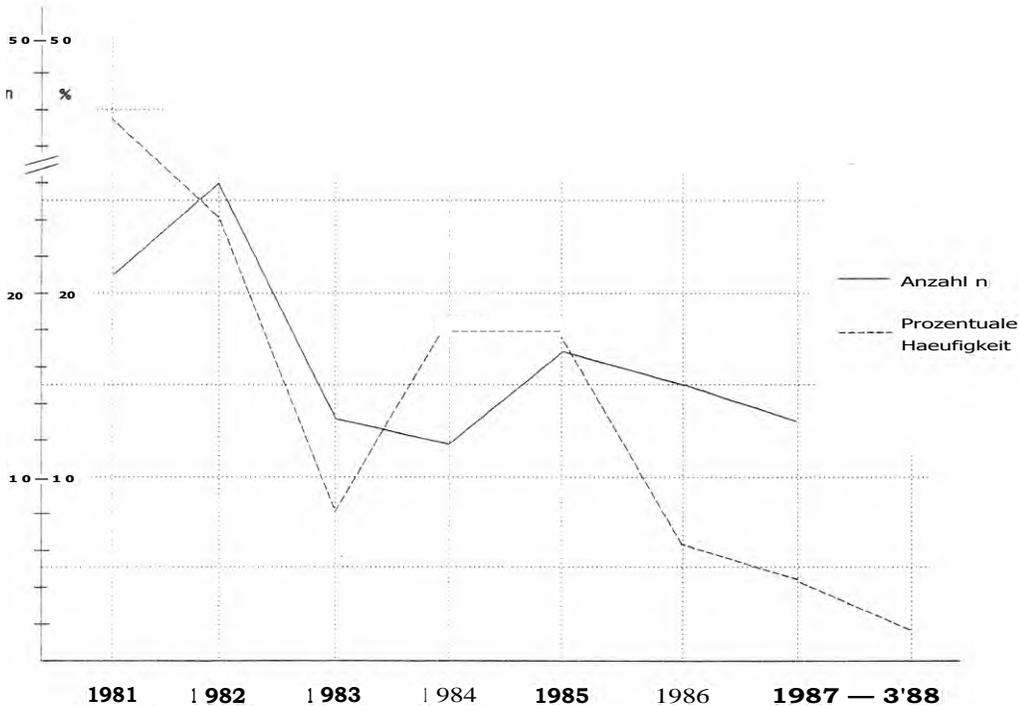


Abb. 2. Relative und absolute Häufigkeiten positiver primärer Keimanzüchtungen

Zellkulturschale wird das Gewebe in die mit einem Volumen von ca. 200 ml des gleichen Mediums gefüllte Organkulturflasche überführt. Die erste Immersionslösung wird zur mikrobiologischen Untersuchung und Keimanzüchtung eingeschickt. Die Organkulturen werden bei einer mittleren Temperatur von 32 °C gelagert.

Am fünften Kulturtag wird das Kulturmedium erneuert und eine zweite Probe zur Anzüchtung eingesandt. Dieser

Zeitraum ist zum Ausschluß langsam wachsender Kulturen, wie etwa Hefen oder Pilze, erforderlich [1, 10, 17]. Zudem lassen sich dann hochresistente Keime, die primär in unter der Nachweisbarkeitsschwelle liegenden Keimdichten vorhanden waren und sich durch die antibiotikabedingte Keimselektion inzwischen ausreichend vermehren konnten, wie zum Beispiel Pseudomonadazeen, sicher nachweisen.

Seit zwei Jahren wird jede Kultur mindestens dreimal

untersucht: nach der Präparation, am fünften Kulturtag und unmittelbar vor der Transplantation.

Ergebnisse

Insgesamt wurden 2885 Keimanzüchtungen durchgeführt, 1054 Primäranzüchtungen, 916 Zweit- und 915 Endanzüchtungen (Abb. 1).

Die mittlere Kulturdauer unserer Organkulturen betrug 17,9 (1-134) Tage, für die transplantierten Gewebe 6,0 (1-42) Tage. Bei Unterteilung nach dem Ergebnis der primären Anzüchtung fanden wir für Gewebe, die sich in primär steriler Kulturlösung befanden, eine mittlere Kulturdauer von 17,9 Tagen (n = 617), 20,8 Tage für solche mit primär verkeimter Lösung (n = 40).

Wir fanden eine relative Häufigkeit positiver primärer Keimnachweise von 11,2% mit einer Schwankungsbreite zwischen 1,9% für die ersten drei Monate 1988 und 45,6 % für 1981 (Abb. 2).

Das Spektrum der gefundenen Keime umfaßt als die vier häufigsten Keime aerobe Sporenbildner in 5,0%, Bazillus-

Tabelle 1. Nachgewiesene Keime in 2885 Anzüchtungen humaner Korneoskleraler Organkulturen (n=268)

Bakterien/Keime	n	% d. Anzüchtungen	% d. Kulturen
I Bacillus spp	86	3.00 %	32.1 %
*Aerobe SporenbildAnzüchtung	2.70 %	29.5%	
• Mikrokokken	28	1.00 X	10.4 %
Staphylokokkus epidermidis	26	0.90 %	9.7 %
*Pseudomonas spezieis	13	0.50 %	4.9 %
Coryne-Bakterien	11	0.40 %	4.1 %
4 Hefen	9	0.30 %	3.3 %
Schimmelpilze	6	0.20 %	2.2%
Staphylokokkus auübrigen		0.10 %	1.1 %
nicht fermentative Keime	3	0.10 %	1.1%
Enterokokken	2	0.07 %	0.7 %
Neisseria spp	1	0.03 %	0.4 %
Enterobacter cloacae	1	0.03 %	0.4 %
Gesamt	268	9.3%	WO 00 X

*: Keime, die unter den In der Kulturlösung enthaltenen Antibiotika bis zur mittleren bzw. letzten Anzüchtung überlebten.

Tabelle 2. Keime aus 1054 Anzüchtungen der ersten Waschlösung

Bakterien/Keime	n	% d. Anzüchtungen	% pos. Kulturen
*Bacillus spp	15	1.42 %	12.7 %
*Aerobe Sporenbildner	53	5.03 %	44.9 %
* Mikrokokken	9	0.85 %	7.6 %
Staphylokokkus epidermidis	12	1.14 %	10.2%
*Pseudomonas spezieis	6	0.57 %	5.1 %
Coryne-Bakterien	8	0.76 %	6.8%
* = efen	7	0.6Häufigkeit	5.9 X
Schimmelpilze	2	Häufigkeiten	1.7 X
Staphylokokkus aureus	3	0.28 %	2.5 %
nicht fermentative Keime	0	0.00 %	0.0 %
Enterokokken	2	0.19 %	1.7 %
Neisseria spp	1	0.09 %	0.8 %
Enterobacter cloacae	0	0.00 %	0.0 %
Gesamt	118	11.20 X	100.0%

*: KeBakterien/Keime den in der Kulturlösung enthaltenen Antibiotika bis zur mittleren bzw. letzten Anzüchtung überlebten. Die Folgekulturen aller tibrigen primärverkeimten Anzüchtungen waren steril.

Tabelle 3. Keime, die in der Organkulturlösung überlebten

Keim	Anzüchtung	
	mittlere	letzte
Aerobe Sporenbildner	2	1
Mikrokokken	1	1
Pseudomonas aeruginosa	2	2 (I Spender
Hefen	2	0
Bacillus species	3	1
Gesamt	10	5

arten in 1,4%, Staphylokokkus epidermidis in 1,1% und Mikrokokken in 0,9% der Erstanzüchtungen der Kulturen. In Tabelle 1 sind die 268 positiven bakteriologischen Befunde aus 2885 Anzüchtungen dargestellt, demgegenüber die 118 positiven Ergebnisse aus 1054 Primäruntersuchungen in Tabelle 2.

Die mit "*" signierten Keime konnten auch in der Sekundär- bzw. letzten Anzüchtung nachgewiesen werden (Tabelle 3), müssen somit als durch die angewandte Antibiotikatherapie nicht erreicht eingestuft werden, wobei eine

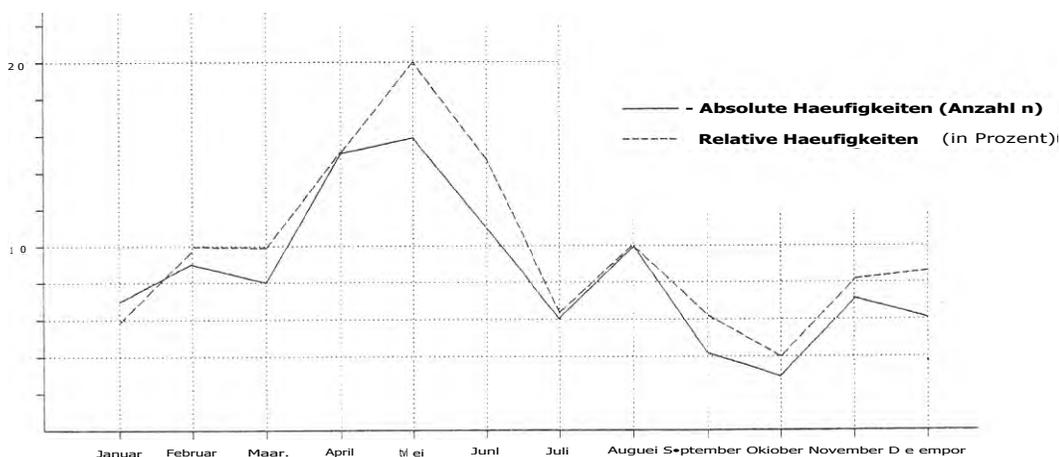


Abb. 3. Monatliche Verteilung der Häufigkeiten der Verkeimungen von Hornhaut-Organokulturen 1981-1988

Sekundärkontamination bei Medienwechsel nicht mit letzter Sicherheit ausgeschlossen werden kann.

Teilt man die primär verkeimten Gewebe nach dem Monat der Verkeimung auf, so findet sich in unseren Beobachtungen über sieben Jahre das Maximum verkeimter Gewebe zwischen April und Juni, und nicht, wie zu erwarten gewesen wäre, in den wärmeren Sommermonaten, und ist über den Rest des Jahres weitgehend konstant (Abb. 3).

Diskussion

Die Darstellung der Anzahl durchgeführter Keimanzüchtungen spiegelt die Entwicklung der Gewebekultivierung unserer Transplantate von der experimentellen Erprobung zur klinischen Routinemethode wieder, wie sie seit 1984 in unserer Klinik eingeführt ist.

In den Jahren der experimentellen Hornhautkonservierung in unserer Klinik wurde nur bei mikroskopischem Hinweis auf Verkeimung im Sediment der Kultur eine Anzuchtung vorgenommen, was einerseits die niedrige Rate der durchgeführten Untersuchungen erklärt und auf der anderen Seite die sehr hohe Verkeimungsrate in den ersten Jahren verständlich macht. Für eine klinische Routinemethode reicht die mikrobiologische Anzuchtung bei Hinweisen auf Kontamination nicht aus. Zur Minimierung des Operationsrisikos für den Organempfänger sind strikte aseptische Arbeitsweise und regelmäßige mikrobiologische Untersuchungen auch der letzten Kulturlösung vor Transplantation erforderlich.

Die relativ hohe mittlere Temperatur der Organkulturen um 32 °C bewirkt ein beschleunigtes Wachstum von Bakterien und Pilzen, die durch die in der Nährlösung enthaltenen Antibiotika nicht erreicht werden. Diese Beschleunigung des Keimwachstums wird in gekühlten Medien nicht beobachtet und bietet eine zusätzliche diagnostische Sicherheit in der mikroskopischen wie makroskopischen Beurteilung der Sterilität einer Organkultur, da unter diesen Temperaturbedingungen eine vorhandene Verkeimung nach einigen Tagen auf jeden Fall sichtbar ist. Bei dann sterilem Befund ist eine primäre Verkeimung weitgehend ausgeschlossen. In späteren Kulturen positive Keimnachweise sind in der Regel durch Sekundärkontamination, zum Beispiel unsteriles Arbeiten bei Medienwechsel, zu erklären und können durch entsprechende Vorsichtsmaßnahmen weitgehend ausgeschlossen werden. Die in der Literatur angegebenen deutlich niedrigeren Verkeimungsraten bei Verwendung gekühlter Konservierungsmethoden [1, 3, 8] bedeuten also nicht eine niedrigere Kontaminationsrate, sondern eine geringere Wahrscheinlichkeit des Nachweises vorhandener Keime bei niedrigerer Keimdichte [19].

Die mittlere Organkulturdauer unserer Spendergewebe liegt bei insgesamt 18, für transplantierte Hornhäute bei sechs Tagen. Dies erklärt sich durch die oben erwähnte Beobachtung, daß langsam proliferierende Keimpopulationen frühestens nach fünf bis sechs Tagen sicher mikrobiologisch erfaßt werden können, weshalb die Transplantate entweder direkt nach der Präparation oder nach mindestens 5-6 Tagen Organkultur verarbeitet werden.

Wir konnten zeigen, daß keine Abhängigkeit zwischen der Verkeimung der Primärkultur und der Kulturdauer besteht, die Kulturdauer also nicht mit dem Vorhandensein von Keimen in den Nährmedien korreliert. Die höhere Kulturdauer der primär verkeimten Hornhäute ist dadurch erklärt, daß diese zwar von der Transplantation ausgeschlossen wurden, nach Keimvernichtung durch die Antibiotika jedoch

weiter kultiviert wurden. Dies zeigt die Wirksamkeit der angewandten Antibiotikamedikation.

Die monatliche Verteilung der Verkeimungen der Organkulturen zeigt ein Maximum für die Monate April und Mai, eine Abhängigkeit von der Umgebungstemperatur ist nicht zu sehen. Dies hat uns insofern überrascht, als wir einen Zusammenhang der Keimdichte in der Konjunktiva mit der Außentemperatur und damit auch eine Auswirkung auf die Verkeimung der Organkulturen erwartet hatten. Dies Ergebnis läßt zwei Interpretationsmöglichkeiten zu: entweder es besteht keine Auswirkung der Umgebungstemperatur auf die Keimbeseidlung der Konjunktiva; oder eine erhöhte Keimdichte bei zunehmender Umgebungstemperatur wirkt sich bei ausreichend effektiver Desinfektion nicht auf die Verkeimungsrate der Organkulturen aus. Das heißt, daß eine höhere Umgebungstemperatur für die Sterilität organkultivierter Gewebe keine Rolle spielt.

Das Keimspektrum entspricht nach der Häufigkeit des Auftretens weitgehend dem der Standortflora der Haut. Die Keime sind in vitro bis auf *Pseudomonas* gegen die verwendete Antibiotikakombination in den angewandten Konzentrationen ausreichend sensibel. Warum dennoch je ein Keimstamm aerober Sporenbildner, Mikrokokken und *Bazillus* überleben konnten, ist unklar.

Pseudomonas wären durch Gentamycin erreicht worden. Auf der anderen Seite wirkt Gentamycin, welches für Organkulturen von Korneoskleralgewebe am häufigsten verwendet wird (z. B. im McCarey-Kaufmann-Medium oder K-Sol), nur bedingt gegen Streptokokken und hat eine Wirklucke gegen Enterokokken, welche in 0.2% unserer Kulturen gefunden wurden. Es wurde eine zunehmende Plasmidabhängige Resistenzentwicklung gegen *Pseudomonas* und insbesondere Staphylokokken beobachtet. Inzwischen werden in mehr als fünf Prozent der Stämme von *Staphylokokkus aureus* Resistenzen gegen Gentamycin beobachtet [18], was die Sicherheit der Therapie in der Klinik erheblich beeinträchtigt. Es bietet den vorgefundenen Keimen gegenüber also insgesamt geringe Vorteile, die jedoch in Frage gestellt werden müssen wegen zunehmender Resistenzentwicklung und damit Selektion resistenter Keime, die dann in der Klinik kaum behandelbar sind.

In Konsequenz dieser Beobachtungen werden in der Hornhautbank der Universitäts-Augenklinik Hamburg Transplantate in der Regel innerhalb der ersten 24 Stunden nach Kulturbeginn oder nach Vorliegen des Ergebnisses der zweiten Anzuchtung zur Transplantation vorgesehen. Die Lagerung der Gewebe erfolgt in großen Volumina, um häufige Medienwechsel und damit die Gefahr sekundärer Verkeimung zu vermeiden. Wir verzichten bewußt auf den Einsatz von in breiten Spektren wirksameren Antibiotika, insbesondere Gentamycin, um deren Effektivität im Einsatz bei sich entwickelnder intraokularer Infektion nicht durch Resistenzentwicklung zu reduzieren. Eine möglicherweise geringfügig höhere primäre Verkeimungsrate wird dafür in Kauf genommen [9, 17].

Literatur

1. Brightbill FS, Terrones C, Gould S (1976) Experimental studies with *Staphylococcus aureus* in M-K media. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 15: 32-34
2. Chittum ME, Grutzmacher RD, Oiland DM, Kalina RE (1985) Contamination of corneal tissue from infected donors. *Arch Ophthalmol* 103: 802-804

3. Christenson J, Kastl PR, Caldwell DR (1982) Bacterial contamination of donor corneas stored in McCarey-Kaufman medium. *Ophthalm Surg* 13: 231-233
4. Clark WM, Heaton KT, Snider GR, Reeve RB, Caskey PJ, Olson RJ (1982) Donor eye contamination. *Am J Ophthalmol* 94: 395-397
5. Graul EE, Olson RJ, Janney A (1980) Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to modern eye-banking technique. *Ann Ophthalmol* 12: 429-432
6. Keates RH, Mishler KE, Riedinger D (1977) Bacterial contamination of donor eyes. *Am J Ophthalmol* 84: 617-619
7. Khodadoust AA, Franklin RM (1979) Transfer of bacterial infection by donor cornea in penetrating keratoplasty. *Am J Ophthalmol* 87: 130-132
8. Kurica PJ, Olson PJ, Lewis AC (1980) Bacterial contamination of McCarey Kaufman medium. *Ann Ophthalmol* 12: 968-969
9. Leveille AS, McMullan FD, Cavanagh HD (1983) Endophthalmitis following penetrating keratoplasty. *Ophthalmology* 90: 38-39
10. Nelson JD, Mindrup EA, Chung CK, Lindstrom RL, Doughman DJ (1983) Fungal contamination in organ culture. *Arch Ophthalmol* 101: 280-283
11. Pardos GJ, Gallagher MA (1982) Microbial contamination of donor corneas. *Arch Ophthalmol* 100: 1611-1613
12. Polack FM, Khorazo DL, Gutierrez E (1967) Bacterial study of "donor" eyes. *Arch Ophthalmol* 78: 219-225
13. Poole TG, Insler MS (1984) Contamination of donor cornea. *Am J Ophthalmol* 97: 560-564
14. Rollins HJ, Stocker FW (1965) Bacterial flora and preoperative treatment of donor corneas. *Am J Ophthalmol* 59: 247-249
15. Sperling S, Srensen IG (1981) Decontamination of cadaver corneas. *Acta Ophthalmol* 59: 126-133
16. Sugar J, Liff J (1980) Bacterial contamination of corneal donor tissue. *Ophthalm Surg* 11: 250-252
17. Yau CW, Busin M, Avni I, Kaufman HE (1986) Antibacterial effect of donor corneas stored in gentamycin enriched McCarey-Kaufman medium. *Arch Ophthalmol* 104: 263-265
18. Knothe H, Dette GA (1984) *Antibiotica in der Klinik: Aminoglykoside*, 2. Aufl. Aesopus-Verlag, S 214-228

Korrespondenz: Dr. J. Garweg, Universitäts-Augenklinik, Martinstraße 52, D-2000 Hamburg 20.