

Schlüsselwörter

- Reinigung
- EN ISO 15883
- Prüfanschmutzung
- Standardisierung

Ringversuch zur Standardisierung einer praxisrelevanten Prüfanschmutzung zur vergleichenden quantitativen Bewertung der Reinigung in Anlehnung an EN ISO 15883 – Versuchsbeschreibung

J. Köhnlein¹, R. Glasmacher², V. Heide², D. Kunde³, M. Mohr³, D. Otto⁴, M. Pieper⁶,
K. Roth⁵, J. Staffeldt⁴, P. Tiarks⁴, S. Wagenknecht⁵, H.-P. Werner¹, W. Michels*

Die Ad-hoc-Gruppe „Prüfanschmutzung und Methoden“ des Normenausschusses NA Med 063-04-09 des DIN hatte in einer vorherigen Ausgabe dieser Zeitschrift über erste Ergebnisse eines Ringversuchs mit einem ‚in vitro-Referenzsystem‘ zur vergleichenden Bewertung von Prüfanschmutzungen für Reinigungs- und Desinfektionsgeräten (RDG) entsprechend ISO 15883-1 und ISO/TS 15883-5 berichtet. Dabei wurden über Materialien und Methoden orientierende Angaben gemacht. Dieser Beitrag gibt nun detaillierte Informationen zur Durchführung der Versuche.

Einleitung:

Die zum Nachweis der Reinigungswirkung von Reinigungs- und Desinfektionsgeräten (RDG) seit 2005 in der „Technischen Spezifikation ISO/TS 15883-5“ (1) veröffentlichten Prüfanschmutzungen haben von der subjektiven Beurteilung her mehr oder weniger Praxisrelevanz. Letztlich muss diese Relevanz nachweislich durch quantitative Prüfungen belegt werden, damit Tests z. B. im Rahmen der Typprüfung mit einer hinreichend hohen Wahrscheinlichkeit Auskunft darüber geben, dass das RDG und die Prozesse die Aufgaben in der Praxis erfolgreich zu erledigen in der Lage sind.

Die Prüfanschmutzung für chirurgische Instrumente soll möglichst praxisnah sein, d. h. sie soll das Verhalten des vorrangig nach Anwendung der Instru-

mente anzutreffenden nativen Humanblutes simulieren. Es geht bei der Prüfung der Reinigungsleistung im Rahmen der Typprüfung darum festzustellen, ob das RDG und die Prozesse die als grundlegend zu bezeichnenden Anforderungen erfüllt. Die das Reinigungsergebnis beeinflussenden maßgeblichen Eigenschaften sind zum Beispiel die Koagulation, die Polymerisation (Fibrin), die Denaturierung/Fixierung (Temperatur/Chemie), die Schaumbildung (Spüldruck) usw., welche sich im Ablöseverhalten unter verschiedenen Bedingungen widerspiegeln. Kinetische Untersuchungen des Lösungsverhaltens von Anschmutzungen im Vergleich zu realen Anschmutzungen können Auskunft über die Praxisrelevanz geben, bzw. über die Qualität der Praxisimulation.

Die Etablierung der Ablösekinetiken unter verschiedenen Bedingungen, wie sie beim maschinellen Reinigungsprozess relevant sind, wurde bereits berichtet (2). Dieses ist mit der im Folgenden detailliert beschriebenen Versuchsdurchführung möglich.

Material und Methodik

Versuchsaufbau

Die Prüfapparatur zur Etablierung von Ablösekinetiken sollte möglichst aus, üblicherweise in Laboratorien vorhandenen, Gerätschaften bestehen. Eine Spülvorrichtung ist schwer standardisierbar. Ein Ablösen im Tauchbad kann den ungünstigen Fall von zu reinigenden Instrumentenflächen in einem RDG

simulieren, die nicht direkt von Spülstrahlen getroffen werden und über welche das Spülwasser im Wesentlichen nur herüberläuft. Um dieses im Labor zu simulieren, muss nur ein moderater, aber gleichmäßiger Flüssigaustausch gegeben sein.

Von entscheidender Bedeutung sind die gleichartigen Geometrien und die Flüssigkeitsbewegung im Tauchbad. Als solches wurde ein 100 ml Becherglas, niedrige Form, (VWR, Darmstadt, Best.Nr. 213-1122) gewählt. Zur Bewegung der Flüssigkeit wurden Magnetrührer (Heidolph, Schwabach bzw. IKA, Staufen) mit der Feineinstellung bei 350 U/min (+/- 20) eingesetzt sowie Magnetrührstäbchen der Länge 25 mm und dem Durchmesser 6 mm (VWR, Darmstadt, Best.Nr. 442-4524). Auf den Magnetrührer wird zunächst ein Was-

* Dr. Winfried Michels, Miele & Cie. KG, Carl-Miele-Str. 29, D-33332 Gütersloh
E-mail: winfried.michels@miele.de

1 Hyg Cen GmbH, Bornhövedstr. 78, D-19055 Schwerin

2 Ecolab Deutschland GmbH, Reisholzer Werftstr. 38 – 42, D-40589 Düsseldorf

3 Schülke & Mayr GmbH, Robert-Koch-Str. 2, D-22851 Norderstedt

4 Chemische Fabrik Dr. Weigert GmbH & Co. KG, Mühlenhagen 85, D-20539 Hamburg

5 SMP GmbH, Hechinger Str. 262, D-72072 Tübingen

6 Miele & Cie. KG, Carl-Miele-Str. 29, D-33332 Gütersloh

serbad gestellt und in dieses das mit 100 ml der zu prüfenden Lösung gefüllte Becherglas mit Magnetührstäbchen. Das Wasserbad wird mit Wasser gefüllt, so dass der Wasserstand bei der 80 ml Markierung des Becherglas liegt. Das Wasser wird über einen Umlaufthermostat rezirkuliert und die festgelegte Prüftemperatur mit einer Genauigkeit von ± 1 °C eingehalten. Die Kontrolle erfolgt über kalibrierte Temperaturfühler im Becherglas sowie im Wasserbad. Die Prüfkörper werden mittels einer Arterienklemme nach Crile, die an einer Stativklemme befestigt ist, mittig in der Lösung im Becherglas exponiert.

Prüfkörper

Um zwei unterschiedliche Oberflächen zu prüfen, wurden Prüfkörper aus Mattglas (15×60×1 mm, Menzel-Gläser, Braunschweig) und Edelstahl (15×50×1 mm, Pereg, Waldkraiburg) ausgewählt. Die Prüfkörper wurden vor der Verwendung grundgereinigt. Dazu wurden sie zunächst mit einem Schwamm unter fließendem Wasser von groben Verunreinigungen befreit, danach in 5%iger Decon90-Lösung (VWR, Darmstadt, Best.Nr. 148-0324) für 10 Minuten aufgekocht und die Lösung anschließend abgossen. Gehalten mittels Pinzette wurden die Prüfkörper jeweils 5 Sekunden unter fließendem vollentsalztem Wasser abgespült und dann kurz in 70%igem Ethanol getaucht. Die Trocknung erfolgte danach auf Filterpapier an der Raumluft.

Prüfanschmutzungen und Anschmutzung der Prüfkörper

Als Prüfanschmutzungen wurden zunächst heparinisieretes Schafblut (Best.Nr. 31400500) sowie citriertes Schafblut (Best.Nr. 31200100), beide von Fiebig Nährstofftechnik, Idstein-Niederauhoff, verwendet. (*Anmerkung:* Das Blut soll möglichst frisch und nicht älter als eine Woche sein. Das Blut wird bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt und vor Gebrauch ein Aliquot entnommen und zunächst auf Raumtemperatur erwärmen lassen.)

Zu 9 ml heparinisiertem Blut wird 1 ml HPLC-Wasser (Merck Chemicals, Darmstadt, Best.Nr. 1153332500) ge-

ben, durchmischt und die Gerinnung durch Zugabe von 150 µl Protaminhydrochlorid (50 mg in 5 ml = 1000 I.E./ml, ICN Pharmaceuticals, Frankfurt) reaktiviert. Bei 10 ml citriertem Schafblut erfolgte die Reaktivierung durch Zugabe von 300 µl einer 250-mmol-Calciumchlorid-Lösung.

Die Anschmutzung der Prüfkörper erfolgte mit jeweils 100 µl des Blutes durch gleichmäßige Verteilung mittels einer Pipette auf einer Fläche von 1 × 2 cm am unteren Ende des Prüfkörpers. Für die spätere Messung der Ausgangsmenge als Protein wurden dabei auch zwei Prüfkörper in Schraubröhrchen mit einer Vorlage von 5 ml 1%iger Natriumdodecylsulfat (SDS)-Lösung (stets mit 0,1 molarer Natriumhydroxid-Lösung auf pH 11 eingestellt) und Mikroglassperlen gegeben. Zusätzlich wird der Proteingehalt des Blutes ermittelt, indem man zwei 100 µl Proben ebenfalls in Schraubröhrchen mit vorgelegten 5 ml 1%iger Natriumdodecylsulfat (SDS)-Lösung pipettiert.

Trocknung bzw. Konditionierung

Nachdem durch Antrocknung für 1,5 Stunden im Brutschrank bei 30 °C sehr abweichende Ergebnisse unter den beteiligten Laboratorien des Ringversuchs erzielt wurden, erfolgte eine Konditionierung unter strikt definierten Bedingungen. 140 g Kaliumcarbonat wurden in 100 ml vollentsalztem Wasser aufgekocht und dann abkühlen lassen. Die gesättigte Lösung wurde in eine große Petrischale überführt und auf den Boden eines Exsikkators gestellt. In dem Exsikkator wurde ein Feuchtefühler (z. B. Almemo, Holzkirchen) befestigt, dieser dann verschlossen und in einen Brutschrank bei 30 °C eingestellt. Nach wenigen Stunden stellte sich eine relative Feuchtigkeit von 45% ein. Die Prüfkörper wurden nach der ersten Gerinnung an der Raumluft, etwa 15 Minuten nach der Anschmutzung in offenen Petrihalbschalen in den Exsikkator eingestellt und so für 24 (± 2) Stunden konditioniert. Danach wurden die Prüfkörper in Petrischalen überführt, luftdicht verschlossen (z. B. Parafilm) und für die Durchführung der Versuche bereitgestellt.

Versuchsdurchführung

Bechergläser mit 100 ml HPLC-Wasser bzw. der zu prüfenden Lösung (ohne oder mit Reinigungsmittel) wurden in einem Wasserbad vortemperiert. Für jeden Einzelversuch mit einer festgelegten Expositionszeit zur Etablierung einer Kinetik (60 oder 30 Sekunden-Intervalle) wurde je ein Becherglas mit Magnetührstäbchen versehen, in das Wasserbad auf dem Magnetrührer gestellt, bei 350 Umdrehungen pro Minute gerührt und die exakte Temperaturangleichung z.B. 45 °C ± 1 °C abgewartet. Bei Erreichen der Zieltemperatur wurde bei unseren Versuchen zur Nullwertkontrolle des Wassers bzw. der Reinigerlösung dem Becherglas 5 ml entnommen. Danach wurde der Prüfkörper jeweils mittels der Crile-Klemme durch Befestigung an der Stativklemme mittig in das Becherglas gehängt und gleichzeitig die Stoppuhr gestartet. Exakt nach Ablauf der anzuwendenden Expositionszeit wurde der Prüfkörper wieder entnommen. Es wurde zur Kontrolle der Methode auch jeweils ein Aliquot der Lösung dem Becherglas entnommen. Anschließend wurde die Ausgangsmenge bzw. 100%-Probe, das Restprotein auf dem Prüfkörper, der Proteingehalt in der Flüssigkeit des Becherglases sowie auch die Nullwertprobe quantitativ analysiert. Die Probe-gewinnung bei den Prüfkörpern erfolgte mittels Elution.

Elution des Restproteins vom Prüfkörper

Die Prüfkörper wurden jeweils in Schraubröhrchen (15 ml, Sarstedt, Nümbrecht, Best.Nr. 60/732.001) überführt. In diese waren zuvor Mikroglasskugeln (200 – 420 µm, Potters Europe, Kirchheimbolanden, gereinigt wie die Prüfkörper) bis zur 1-cm-Marke sowie 5 ml 1%ige Natriumdodecylsulfat (SDS, pH 11)-Lösung gegeben worden. Die Schraubröhrchen wurden dann auf einem Horizontalschüttler (z. B. IKA MS2 von IKA, Staufen) 20 min bei 300 U/min intensiv bewegt. Anschließend wurden die Prüfkörper mit einer Pinzette wieder entnommen und ein Aliquot des Eluates der Proteinbestimmung zugeführt. Prüfkörper und Mikroglasskugeln wurden anschließend

der Grundreinigung, wie unter „Prüfkörper“ beschrieben, unterzogen.

Proteinanalytik

Die Bestimmung des Blutproteingehaltes, der Ausgangskontamination der Prüfkörper, des eventuellen Proteingehaltes der Prüflösung, des Restproteins auf den Prüfkörpern nach Exposition und des abgelösten Proteins in der Flüssigkeit des Becherglases erfolgte mit der modifizierten OPA-Methode. Als Thiolkomponenten wurden entweder N,N-Dimethyl-2-mercapto-ethylammoniumchlorid oder 2-Mercaptoethansulfonsäure verwendet, welche beide zu stabilen, fluoreszierenden 1-Alkylthio-2-alkylisindolen, deren Absorptionsmaximum bei 340 nm zu detektieren ist, führen (3, 4).

Mit den Thiolkomponenten wurden jeweils frische OPA-Lösungen hergestellt. Dazu wurden 80 mg o-Phthaldialdehyd in 2 ml Methanol gelöst zu 50 ml 0,1 mol/l (2,0122 g/50 ml) Dinatriumtetraborat-Puffer (pH 9,3) gegeben und 200 mg N,N-Dimethyl-2-mercapto-ethylammonium-chlorid beziehungsweise 234 mg 2-Mercaptoethansulfonsäure als Natriumsalz zugegeben und mit 2,5 ml wässrige 20%ige Natriumdozylsulfatlösung versetzt (Chemikalien: Merck, Darmstadt; Serva, Heidelberg). Es wurden immer gleiche Mengenverhältnisse von Probelösung zu OPA-Lösung gemessen: z. B. wurden 400 µl Probe zu 2 ml OPA-Lösung in eine Quarz-Küvette oder geeignete Einküvette gegeben, durchmischt und die Extinktion gegen reine OPA-Lösung

mittels Photometer (z. B. Varian, Darmstadt, Cary 100) nach 3 Minuten die Extinktion bei 340 nm abgelesen. Das Verhältnis der Menge Probe zu OPA-Lösung sollte 1:1 nicht überschreiten. Gelegentlich ist die Einhaltung des pH-Wertes von 9,3 zu überprüfen, da dieser bei größerem Probenanteil eher abweichen kann. Vorteilhaft ist die Messung mit Zweistrahl-Photometer, so dass der Nullabgleich automatisch gegen reine OPA-Lösung erfolgt. Die Messungen der Eigenextinktionen wurden bei gleichem Mengenverhältnis von Probelösung zu einer Lösung aus 2,0122 g Dinatriumtetraborat (pH 9,3), 2 ml Methanol und 2,5 ml 20%iger SDS-Lösung in 50 ml HPLC-Wasser gegen dieselbe Lösung ohne Probe vorgenommen. Zur Berechnung der Proteinmenge in Äquivalent Rinderserumalbumin, ist es sinnvoll unter den o. g. Mischungsverhältnissen Bezugsbestimmungen bei Proben einer Verdünnungsreihe aus reinem Rinderserumalbumin (Fraktion V, Serva, Heidelberg) durchgeführt zu haben (Kalibriergerade).

Ausblick

Inzwischen wurden Ringversuche mit der hier beschriebenen Methodik der Ad-hoc-Gruppe von einer weiteren Gruppe Laboratorien im Rahmen der Erarbeitung einer Leitlinie zur Validierung von Prozessen in Reinigungs-Desinfektionsgeräten für flexible Endoskope durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten eine gute Übereinstimmung (5). Dies belegt, dass die vorgestellte Methodik

gut geeignet und auch von anderen Laboratorien ohne große finanzielle und zeitliche Investitionen durchzuführen ist.

Die Ad-hoc-Gruppe erarbeitet nun Ablösekinetiken mit den, in der ISO/TS 15883-5 beschriebenen Testansammlungen sowie nativem Humanblut, um so eine vergleichende Bewertung zu ermöglichen. *

Literatur

1. Reinigungs-Desinfektionsgeräte – Teil 5: Prüfansammlungen und -verfahren zum Nachweis der Reinigungswirkung (ISO/TS 15883-5:2005)
2. Köhnlein J, Glasmacher R, Heide V, Kunde D, Mohr M, Otto D, Roth K., Staffeldt J., Tiarks, P., Wagenknecht S., Michels W: Ringversuch zur Standardisierung einer praxisrelevanten Prüfansammlung zur vergleichenden quantitativen Bewertung der Reinigung in Anlehnung an EN ISO 15883. Zentr Steril 2008 16 (6): 424–435.
3. Frister H, Michels W: Vergleichende Bewertung und Optimierung der Reinigungsleistung maschineller Dekontaminationsverfahren. HygMed. 1994; 19 (12): 673–688.
4. Michels W, Frister H: The modified OPA method with an alternative thiol component. Zentr Steril 2004; 12: 117–118.
5. Persönliche Mitteilung der Leitliniengruppe mit Vertretern der Gesellschaften DEGEA (Deutsche Gesellschaft für Endoskopie-assistenzpersonal), DGKH (Deutsche Gesellschaft für Krankenhaushygiene), DGSV (Deutsche Gesellschaft für Sterilgutversorgung), AKI (Arbeitskreis Instrumentenaufbereitung)