

Vergleichende Bewertung der Wirkung von Prozessparametern sowie enzymatischen Reinigern bei der maschinellen Aufbereitung

Winfried Michels

I Einleitung

Bei der Aufbereitung von chirurgischen Instrumenten in Reinigungs-Desinfektionsgeräten (RDG) werden derzeit in Europa für die Reinigung vornehmlich mildalkalische, enzymatische und Tenside enthaltende Reiniger eingesetzt. Dieses kommt dem Betreiberwunsch entgegen, möglichst nur eine Prozesschemie für möglichst alle aufzubereitenden Medizinprodukte und dafür festgelegten Prozesse zu verwenden. Diese mildalkalischen Reiniger mit dem pH-Wert von etwa 10 in der Anwendungskonzentration sind materialverträglich bei Edelstahl, Kunststoffen, Elastomeren und selbst bei Aluminium. In der Regel werden diese Reiniger bei den von den Herstellern in den Standardprozessen festgelegten Reinigungsbedingungen eingesetzt. Die von den Herstellern der Prozesschemie gegebenen Anwendungsempfehlungen sind so weit gefasst, dass sie in praktisch jedem vorgegebenen Prozess auch verschiedener RDG von unterschiedlichen Herstellern eingesetzt werden können. So wird beispielsweise für ein Produkt die Konzentration von 2 bis 10 ml/l mit dem Hinweis auf die Abhängigkeit vom Verschmutzungsgrad sowie die Temperatur von 40 bis 60 °C bei 10 Minuten Einwirkzeit empfohlen. Dieses breite Spektrum möglicher Bedingungen lässt Zweifel aufkommen, ob die Empfehlungen so wirklich zielführend für eine effiziente Reinigung sind. Wenn die Enzyme einen bedeutsamen Beitrag zur Reinigung leisten, dann sollten aufgrund der Temperatur- und pH-Abhängigkeit konkretere und enger gefasste Bedingungen erwartet werden.

Bis heute gibt es keine normativen Anforderungen an Reinigungsmittel für die Aufbereitung von Medizinprodukten und auch

keine Test- und Bewertungsmethoden zur Leistungsfähigkeit. Die für die RDG relevante Normenreihe ISO EN 15883 fordert in Bezug auf die Einsatzbedingungen lediglich, dass die Dosierung des Reinigungsmittels nachvollziehbar mit einer Toleranz von +/- 5 Volumenprozent erfolgt und die Temperatur innerhalb des Reinigungstemperaturbandes der festgelegten unteren Grenze und der oberen Grenze von plus 10 °C liegen muss, sich innerhalb der Beladung dabei aber um nicht mehr als 5 °C unterscheiden dürfen. Diese Anforderungen sind in Bezug auf die Dosierung möglicherweise zu eng gefasst und in Bezug auf die Reinigungstemperatur eher zu großzügig.

Um einen Eindruck über die Leistung zweier marktüblicher mildalkalischer, enzymatischer Reinigungsmittel bei unterschiedlichen Konzentrationen und Temperaturen zu bekommen, wurde mittels eines Testaufbaus, in Anlehnung an die Prüfapparatur der DIN-Ad-hoc-Gruppe (1) Untersuchungen durchgeführt.

I Material und Methoden

Als Behandlungsbad dient ein 150 ml Becherglas, welches mit 150 ml der zu prüfenden Reinigungslösung gefüllt wird. Dieses wird auf einem Magnetrührer mit Heizung und Temperaturregelung (C-MAG HS7, Carl Roth, Karlsruhe) temperiert. Wenn die eingestellte Temperatur sich eingependelt hat, wird diese mit einer Toleranz von +/- 1 °C gehalten. Das Bad wird mittels einem mit Teflon ummantelten Magnetührstab der Länge 35 mm und einem Durchmesser von 6 mm (Best.Nr. 1292, Carl Roth, Karlsruhe) mit 300 Umdrehungen pro Minute bewegt. Diese Bewegung



Abb. 1: Testaufbau zur Prüfung der Reinigungswirkung

entspricht einem Überfließen von Spülflotte über ein zu reinigendes Medizinprodukt, welches weder von direkten noch indirekten Spülstrahlen in einem Reinigungs-Desinfektionsgerät (RDG) behandelt wird. Das ist eine Situation, die real durchaus gegeben sein kann. Abbildung 1 zeigt den Testaufbau.

Als Prüfkörper werden Edelstahlplatten 1.4301 von 75 mm Länge und 25 mm Breite verwendet mit einem Längsschliff mit der Körnung 80. Diese Prüfkörper werden jeweils mit 50 µl heparinisierendem Schafs-

blut (Artikel Nr. 2132005, ACILA GmbH, Mörfelden), welches unmittelbar zuvor mittels Protaminsulfat reaktiviert wird, angeschmutzt. Die Anschmutzung erfolgt mit einer Schablone entsprechend der publizierten Methode von Brill et al. (2). Danach werden die Prüfkörper im Exsikkator bei 30 °C über gesättigter Kaliumcarbonat-Lösung für 24 Stunden konditioniert. Die Exposition der einzelnen Prüfkörper erfolgt mittig im Becherglas bei der jeweiligen Prüftemperatur und in der jeweiligen Prüfkonzentration mit einer Wirkzeit von 10 Minuten. Das entspricht der in RDG üblichen Exposition während der Wirkzeit der Reinigungsstufe. Anschließend werden die Prüfkörper von der Haltevorrichtung genommen, beidseitig mit jeweils etwa 5 ml vollentsalztem Wasser mittels Laborspritzflasche vorsichtig auf jeder Seite abgespült und zum Trocknen an der Raumluft auf eine saugfähige Unterlage gelegt. Zur Probengewinnung werden die getrockneten Prüfkörper jeweils in ein 500 ml Becherglas überführt und zwar mit der Fläche mit der Restanschmutzung nach unten zum Boden der Gläser weisend. Es werden 5 ml 1% Natriumdodecylsulfat-Lösung (SDS) hinzu pipettiert und die Bechergläser jeweils 4 bis 5 cm tief in ein Ultraschallbad (SONOREX RK 102H, Bandelin, Berlin) gehalten und leicht hin und her geschwenkt, so dass die Prüfkörper leicht aufschwimmen. Die Solubilisierung des Restschmutzes erfolgt so bei einer eingestellten Badtemperatur von 45 °C über 2 Minuten. Die Benetzung so eluierter Prüfkörper mit essigsaurer Ponceau S-Lösung ergab keine Anfärbung von Restprotein. Ein Aliquot der erhaltenen Lösung wird der Proteinquantifizierung zugeführt.

Da die Reinigungsmittel primäre Amine als Inhaltsstoff enthalten, die bei der OPA-

Methode zu verfälschten Ergebnisse führen und das Abspülen mit vollentsalztem Wasser nicht standardisiert ist, wird die modifizierte BCA-Methode Roti®-Quant universal (Artikel 0120.1, Carl Roth, Karlsruhe) mit photometrischer Messung bei 503 nm angewendet, welche eine hinreichend hohe Sensitivität und gute Linearität aufweist. Die Bestimmungsgrenze liegt bei etwa 4,0 µg Protein (BSA) je ml 1% SDS-Lösung.

Bei den Untersuchungen kamen drei Reinigungsmittel zum Einsatz (Charakterisierung gemäß Herstellerangaben):

A: mildalkalischer-enzymatischer Reiniger mit Tensiden (pH etwas über 10)

B: mildalkalischer Reiniger entsprechend A, jedoch ohne Enzyme (pH-Wert etwas über 10)

C: Reiniger mit Alkalispendern, Enzymen und Tensiden (pH-Wert etwas über 10)

I Ergebnisse

Zur Ermittlung der Wiederfindungsrate bei beschriebener Anschmutzung und Probengewinnung wurde zuerst die Proteinmenge in 50 µl Blut bestimmt. Dazu wurde 50 µl heparinisiertes und reaktiviertes Schafsblut direkt in 10 ml 1% SDS-Lösung pH 11 gegeben und ein Aliquot der Bestimmung zugeführt. Drei unabhängige Ansätze ergaben einen Mittelwert von 8006 µg Protein mit einer Standardabweichung von 234 µg. Anschließend wurden Prüfkörper mit 50 µl heparinisiertem und reaktiviertem Schafsblut angeschmutzt, nach der Konditionierung wie unter Material und Methoden beschrieben mit Ultraschallunterstützung eluiert und ein Aliquot der Proteinbestimmung zugeführt. Drei unabhängige Ansätze ergaben einen Mittelwert von 8083 µg Protein mit einer Standardabweichung von 193 µg. Dieses

entspricht somit einer Wiederfindung von 101%.

Ein Vorversuch mit dem Testaufbau wurde mit vollentsalztem Wasser ohne Reinigungsmittelzusatz durchgeführt und Prüfkörper bei 55 °C mit 5 Minuten Wirkzeit sowie 10 Minuten Wirkzeit behandelt. Der Restproteingehalt nach 5 Minuten lag bei 396,5 µg pro Prüfkörper und nach 10 Minuten Wirkzeit bei 390,0 µg pro Prüfkörper. Nach 5 Minuten sind nur noch weniger als 5% der ursprünglichen Anschmutzung vorhanden, die sich dann bei längerer Wirkzeit kaum noch ändert. Prüfkörper wurden mit dem Testaufbau mit einer Konzentration von 0,5% der Reinigern A, B und C bei 50, 55 und 60 °C mit jeweils 10 Minuten Wirkzeit behandelt, um zu prüfen, ob sich in diesem Temperaturintervall deutliche Änderungen der Reinigungswirkung ergeben. Denn die Norm ISO EN 15883 lässt diese Spannbreite in der Reinigungsstufe zu. Bei der in der Regel von den Herstellern der RDG vorgegebenen und auch von den Prozesschemikalienherstellern empfohlenen Temperatur von 55 °C wurde die Reinigungsmittelkonzentration variiert und zusätzlich zu der Konzentration von 0,5% auch die Konzentrationen 0,4%, 0,6% und 1,0% geprüft. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 dargestellt.

Auch optisch waren die Restproteinmengen recht gut zu differenzieren. Um dieses darzustellen wurden Prüfkörper nach 10 Minuten Behandlung mit dem Testaufbau bei 55 °C und 0,5%iger Konzentration der Reiniger A, B und C mit essigsaurer Lösung Ponceau S benetzt und nach 3 Minuten Einwirkung mit vollentsalztem Wasser abgespült. Das Ergebnis ist in Abbildung 2 zu sehen.

Tab. 1: Restprotein in µg pro Testobjekt nach 10 Minuten Haltezeit bei verschiedenen Temperaturen und Konzentrationen. (< LD = kleiner als die Nachweisgrenze).

Temperatur / Konzentration	50°C / 0.5%	55°C / 0.5%	60°C / 0.5%	55°C / 0.4%	55°C / 0.6%	55°C / 1.0%
Reiniger A	22.5	< LD	< LD	33.0	< LD	< LD
Reiniger B	278.5	289.0	580.0	217.0	181.0	130.0
Reiniger C	61.0	90.0	303.5	160.0	102.5	21.0

I Diskussion

Der Testaufbau erweist sich als geeignet, die Reinigungswirkung unter verschiedenen Bedingungen im RDG zu prüfen. Insbesondere die Art der Probengewinnung mit Ultraschallunterstützung, welche eine annähernd 100%ige Wiederfindung des Restprotein ermöglicht, ist für eine objektive Beurteilung der Reinigungswirkung in der Effizienz unabdingbar. Selbst mit Wasser ohne Reinigungsmittelzusatz sind in sehr kurzer Zeit 95% der Anschmutzung entfernt und es kommt dann auf eine differenzierte Beurteilung der letzten wenigen Prozente des Restprotein an, welches in direkter Wechselwirkung mit dem Prüfkörpermaterial ist.

Bei der Anschmutzung mit der Schablone werden 50 µl Blut auf 3 cm² aufgetragen. In den Leitlinien von DGKH, DGSV und AKI für die Validierung von maschinellen sowie manuellen Prozessen ist für die Reinigung das Akzeptanzkriterium von 3 µg/cm² festgelegt (3,4). Das ist noch unterhalb der Bestimmungsgrenze der hier verwendeten BCA-Methode zur Proteinquantifizierung, die bei den 5 ml zur Elution verwendeten SDS-Lösung bei dieser Prüffläche bei etwa 6,7 µg/cm² liegt. Das ist jedoch hier nicht Gegenstand der Betrachtung, da es nur um eine vergleichende Bewertung geht.

Mit dem Reiniger A werden die niedrigsten Restproteinwerte erzielt, die bei Temperaturen von 55 und 60 °C sowie einer Konzentration $\geq 0,5\%$ zu Ergebnissen an Restprotein kleiner der Bestimmungsgrenze liegen. Der Reiniger B hat die gleiche Zusammensetzung wie der Reiniger A, ihm sind nur die Enzyme nicht zugegeben. Der Vergleich des Ergebnisses der beiden Reiniger macht deutlich, wie groß und effizient der Beitrag der Enzymwirkung sein kann. Die Ergebnisse des Reiniger C wiederum zeigen, dass die Enzymwirkung gegenüber Reiniger A deutlich geringer und eigentlich unzureichend ist. Erst deutliche Erhöhung der Konzentration des Reinigers und damit auch der Enzymkonzentration auf 1% führt bei 55 °C zu fast akzeptablen Ergebnissen.

Reiniger A erbringt zufrieden stellende Ergebnisse bei 55 °C und 60 °C in einer Konzentration von 0,5%. Bei Reiniger B ergeben sich bei dieser Konzentration die besten Ergebnisse bei 50 °C und 55 °C und bei Reiniger C ist das bei 50 °C der Fall. Offensichtlich liegt das Temperaturoptimum der Enzymaktivität bei Reiniger C möglicherweise eher etwas unter 50 °C. Da die Enzymausstattung bei diesen mildalkalischen Reinigern offensichtlich eine entscheidende Rolle spielt, wäre zu fordern, dass die Prozesschemikalienhersteller den Temperaturbereich der optimalen Aktivität auch angeben. Nur dann können auch die Prozesse in der praktischen Anwendung wirklich effizient eingestellt werden.

Bei dem Reiniger C werden bei der Prüfung mit 60 °C schon die thermischen Denaturierungs- und Fixierungseffekte deutlich, welche von diesem nicht mehr kompensiert werden. Innerhalb des Temperaturbereichs von 50 bis 60 °C sind sehr große Leistungsänderungen festzustellen. Das ist ein Temperaturbereich, welcher nach der ISO EN 15883-2 in der Reinigungsstufe erlaubt ist (Reinigungstemperaturband von 10 °C). Dagegen ist in der thermischen Desinfektionsstufe nur ein Temperaturband von 5 °C vorgegeben. Die RDG können in der Reinigungsstufe die Temperatur in gleicher Weise einhalten wie in der Desinfektionsstufe und man muss sich fragen, warum die Norm hier derart unterscheidet. Wegen der enormen Leistungsänderung innerhalb der 10 °C Spanne ist dringend zu fordern, dass die Reinigungstemperatur innerhalb von $\pm 2,5$ °C einzuhalten ist. Die Leistung der Reiniger kann sich in einem Temperaturband von 10 °C stärker ändern als durch eine Konzentrationsänderung um 20%. Dieser Erkenntnis ist in Fachkreisen Rechnung zu tragen. ■

I Danksagung

Ich danke der Firma Dr. Schumacher GmbH, Malsfeld, für die Unterstützung der Untersuchung.

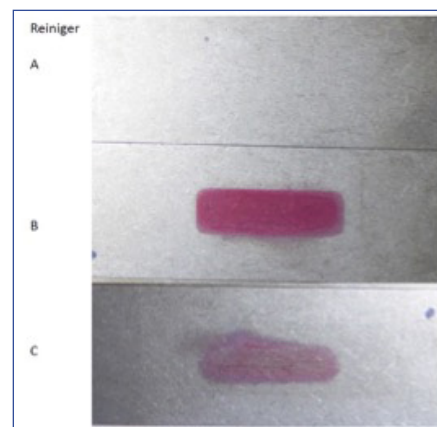


Abb. 2: Prüfkörper nach der Reinigung mit Ponceau S angefärbt.

I Literatur

1. Köhnlein J et al.: Ringversuch zur Standardisierung einer praxisrelevanten Prüfanschmutzung zur vergleichenden quantitativen Bewertung der Reinigung in Anlehnung an EN ISO 15883 – Versuchsbeschreibung. – Multicentre Trial on Standardisation of a Test Soil of Practical Relevance for Comparative and Quantitative Evaluation of Cleaning Pursuant to EN ISO 15883. Description of Test Procedure. Zentr Steril 2009; 17: 410–415
2. Brill FHH et al.: Standardisiertes Verfahren zur Anschmutzung von Prüfkörpern für Reinigungsversuche. – Standardized method for application of test soil pieces in cleaning tests. Zentr Steril 2014; 22: 408–416
3. Leitlinie von DGKH, DGSV und AKI für die Validierung und Routineüberwachung maschineller Reinigungs- und thermischer Desinfektionsprozesse. Zentr Steril 2017; 25 Supplement – Guideline compiled by DGKH, DGSV and AKI for the validation and routine monitoring of automated cleaning and thermal disinfection processes for medical devices. Zentr Steril 2017; 25, Supplement (5th Edition)
4. DGKH, DGSV, AKI. Leitlinie zur Validierung der manuellen Reinigung und manuellen chemischen Desinfektion von Medizinprodukten. Zentr Steril 2013; 21 Supplement – Guideline for Validation of Manual Cleaning and Manual Disinfection of Medical Devices. Zentr Steril 2013; 21, Supplement