

Mitteilung



Arbeitsgruppe Reinigungsmitteltestung - AG RMT der Deutschen Gesellschaft für Krankenhaushygiene, DGKH e.V.

Korrespondierender Autor:

Dr. Markus Wehrl
wfk - Cleaning Technology
Institute e.V.
Campus Fichtenhain 11
47807 Krefeld

m.wehrl@wfk.de

Interessenkonflikt:

Die Autoren erklären, dass keine Interessenskonflikte bestehen. Mitglieder der AG RMT stellten Testprodukte und Informationen diskriminierungsfrei zur Verfügung.

Zitierweise:

Wehrl M., Rosenberg U., Brill F.H.H. et al. Prüfmethode für die vergleichende Bewertung von Instrumentenreinigern zur manuellen Aufbereitung von chirurgischen Instrumenten auf der Basis von Fibrin. Zentr Steril 2018; 26: 366-381.

Manuskriptdaten:

Eingereicht: 10. November 2018
Überarbeitete Version
angenommen:
20. November 2018

Prüfmethode für die vergleichende Bewertung von Instrumentenreinigern zur manuellen Aufbereitung von chirurgischen Instrumenten auf der Basis von Fibrin

M. Wehrl¹, U. Rosenberg², F.H.H. Brill³, H. Gabriel³, A. Kampe³, W. Michels⁴, K. Roth⁵, L. Schnieder⁵, P. Frey⁵, J. Köhnlein⁶, O. Riebe⁶, A. Hartung⁷, R. Bloß⁸, G. Kirmse⁹, M.-T. Linner¹⁰, D. Martini¹¹, M. Tschoerner¹², U. Weber¹³, S. Krüger¹⁴, H. Martiny¹⁵, J. Gebel^{16,17}

¹ wfk - Cleaning Technology Institute e.V., Krefeld; ² Borer Chemie AG, Zuchwil; ³ Dr. Brill + Partner GmbH Institut für Hygiene und Mikrobiologie, Hamburg; ⁴ Prüflabor DWM, Warburg; ⁵ SMP GmbH, Tübingen; ⁶ HygCen Germany GmbH, Schwerin; ⁷ Schülke & Mayr GmbH, Frankfurt a. M.; ⁸ Bode Chemie GmbH, Hamburg; ⁹ Aesculap AG, Tuttlingen; ¹⁰ Hygiene Linner, München; ¹¹ Borer Chemie Deutschland GmbH, Lörrach; ¹² Chemische Fabrik Dr. Weigert GmbH & Co. KG, Hamburg; ¹³ Miele & Cie. KG, Gütersloh; ¹⁴ Hygiene Consulting Grünendeich, Grünendeich; ¹⁵ TechnischeHygiene, Berlin; ¹⁶ Institut für Hygiene und Öffentliche Gesundheit, Universitätsklinikum Bonn AöR, Bonn; ¹⁷ Verbund für Angewandte Hygiene (VAH)

■ Zusammenfassung

Gegenwärtig existieren weder in Deutschland noch international allgemein akzeptierte Methoden zur Überprüfung der Wirksamkeit von Reinigern für die Aufbereitung von Instrumenten. Die Anforderungen, die an eine adäquate Prüfmethode gestellt werden, sind:

- i) Auswahl einer schwierig zu entfernenden praxisrelevanten Testanschmutzung,
- ii) Definierte Aufbringung der Testanschmutzung auf eine relevante Oberfläche,
- iii) Quantitative Elution von Restanschmutzungen sowie
- iv) Festlegung eines repräsentativen Analyten (Leitsubstanz) und adäquater Methoden zur Quantifizierung des Analyten.

Die 2011 gegründete Arbeitsgruppe Reinigungsmitteltestung (AG RMT) der Deutschen Gesellschaft für Krankenhaushygiene e.V. (DGKH) erarbeitete und etablierte eine neue Prüfmethode zur vergleichenden Bewertung von Reinigern für die Instrumentenaufbereitung.

Im Folgenden wird eine auf einem Fibrinprüfkörper (F-PCD) basierende Methode vorgestellt, die es erlaubt, anhand der hochmolekularen und wasserunlöslichen Testanschmutzung Fibrin die Wirksamkeit verschiedener Reiniger in einem Tauchmodell (keine Mechanik) vergleichend zu untersuchen

und verschiedene Instrumentenreiniger hinsichtlich ihrer Wirksamkeit zu unterscheiden. Die Besonderheit der Methode beruht auf dem Einsatz von wasserunlöslichem Fibrin als praxisrelevanter Testanschmutzung. Fibrin gilt als kritische, am schwierigsten zu entfernende Proteinanschmutzungskomponente chirurgischer Instrumente und konnte bislang mittels etablierter Elutions- und Proteinquantifizierungsmethoden nicht erfasst und bewertet werden. Durch die Entwicklung einer

Schlüsselwörter

- chirurgische Instrumente
- Aufbereitung
- Fibrin
- Reinigung
- Instrumentenreiniger

neuen Elutionsmethode kann die wasserunlösliche Fibrinanschmutzung der Prüfkörper in eine solubilisierte Form überführt und mittels etablierter Proteinquantifizierungsmethoden (OPA-, BCA-Methode) erfasst werden. Durch mehrere Ringversuche mit bis zu sechs beteiligten Laboren wurde die Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit der Ergebnisse der neu entwickelten Methode überprüft und bestätigt. Die Arbeiten der AG RMT führten sowohl zur Entwicklung einer neuen Prüfmethode als auch zu einem umfangreich erweiterten Verständnis der vollumfänglichen

Erfassung von Restproteingehalten auf aufbereiteten Medizinprodukten.

■ 1. Einleitung

Die Reinigung stellt bei der Aufbereitung von Medizinprodukten (MP) den ersten und den Prozessschritt mit der grundlegendsten Bedeutung dar. Ziel des Reinigungsprozesses ist die möglichst vollständige Entfernung aller auf den MP vorliegenden Anschmutzungen, ungeachtet der chemischen Natur und der jeweiligen Anschmutzungsmenge. Unabhängig von der Art der Aufbereitung – manuell oder maschinell, ggf. mit teilmaschineller Unterstützung – können nur bei der ausreichenden Entfernung von Anschmutzungen – ggf. als Kombination manueller Vorreinigung und maschineller Reinigung – die nachfolgenden Aufbereitungsschritte der Desinfektion und Sterilisation wirksam durchgeführt und die anforderungsgerechte hygienische Qualität aufbereiteter MP entsprechend MPG [1] und MP-BetriebV [2] sichergestellt werden. Zur Beurteilung der Reinigungswirkung wird üblicherweise der Proteingehalt als Leitparameter für Restanschmutzungen herangezogen [3, 4, 5, 6, 7]. Dies trifft auch für die Bestimmung der Reinigungseffektivität in Reinigungs-Desinfektionsgeräten zu. Andere Parameter, wie z.B. der Gehalt an Polysacchariden, Lipiden und Ölen, Kohlenhydraten, Endotoxinen, Hämoglobin (bezogen auf die Pseudoperoxidaseaktivität), gesamter Kohlenstoffgehalt (TOC), gebundener Stickstoffgehalt (TNB), Adenosintriphosphat (ATP) [8] können Hinweise hinsichtlich der Rückstände spezieller Anschmutzungsarten liefern. Diese Parameter werden jedoch bezüglich ihrer Aussagekraft zur umfassenden Beurteilung der Reinigungswirkung aufgrund der Relevanz der jeweiligen Anschmutzungsart oder der einfachen Entfernbarkeit kritisch diskutiert [9].

Die Wirkung des Reinigungsprozesses basiert auf den vier klassischen Faktoren: i) Chemie, ii) Zeit, iii) Temperatur und iv) Mechanik, entsprechend dem Konzept des Sinner'schen Kreises [10]. Für den Faktor Chemie werden bei der Reinigung von MP spezielle, als Medizinprodukte zugelassene, Instrumentenreiniger eingesetzt. Die Instrumentenreiniger erfüllen bei der Reinigung verschiedene wichtige Funktionen:

- Eine Herabsetzung der Oberflächenspannung des Wassers führt zu

einer schnellen und vollständigen Benetzung aller Instrumentenoberflächen und ermöglicht ein Eindringen der Reinigerflotte in schmale Spalten.

- Eine Solubilisierung von Proteinen wird durch alkalisch eingestellte pH-Werte unterstützt und beschleunigt.
- Der amphiphile Charakter enthaltener Tenside ermöglicht die Dispersion hydrophober Anschmutzungen durch Inklusion in Micellen.
- Die Micellenbildung ermöglicht ein hohes Schmutztragevermögen der Reinigerflotte und verhindert eine Redeposition von Anschmutzungen auf Oberflächen.
- Weitere primär wirksame Inhaltsstoffe von Reinigern können z.B. Enzyme sein, die durch ihre hydrolytische Aktivität eine Degradation hochmolekularer Anschmutzungssubstanzen hin zu niedermolekularen und daher besser wasserlöslichen Produkten bewirken können.

Instrumentenreiniger sind Medizinprodukte der Klasse I entsprechend 93/42/EWG [11], bzw. 2007/47/EG [12]. Anders als bei der Zulassung von Desinfektionsmitteln (MP, Klasse IIb), für die gegenwärtig (Juli 2018) 30 EN-Normen zur Verfügung stehen und 23 prNormen oder „work items“ bearbeitet werden, gibt es für Instrumentenreiniger gegenwärtig weder entsprechende normative Prüfverfahren noch andere allgemein akzeptierte Prüfmethode zur Bewertung der Wirksamkeit. Im Kontrast hierzu wird die Wirksamkeit von Instrumentenreinigern durch üblicherweise nicht offengelegte Prüfungen des jeweiligen Herstellers im Rahmen des Zulassungsverfahrens belegt, sodass für den Anwender von Instrumentenreinigern gegenwärtig keine objektiven Unterscheidungs-/Bewertungskriterien entsprechend publizierter Testmethoden bei der Produktauswahl zur Verfügung stehen.

Die in ISO/TS 15883-5 [13] aufgeführten Prüfmodelle zur Bewertung der Reinigungswirksamkeit sind für die Prüfung von maschinellen Aufbereitungsprozessen in Reinigungs-Desinfektionsgeräten (RDG) vorgesehen. Bei der Auswahl von Prüfanschmutzungen wurden zahlreiche unterschiedliche Vorschläge veröffentlicht, jedoch konnte bislang kein im Konsensus akzeptier-

ter Vorschlag erzielt werden. Dies spiegelt sich in der großen Anzahl der Anhänge der ISO/TS 15883-5 wieder. Bei maschinellen Reinigungsprozessen liefern Mechanik und Temperatur einen großen Beitrag zum Reinigungsergebnis. Daher sind diese Prüfmodelle für die Bewertung des alleinigen Beitrags der Komponente „Reiniger“-Chemie gemäß des Sinner'schen Kreises nicht unverändert anwendbar.

Um zukünftig eine objektive und transparente Beurteilung der Wirksamkeit von Instrumentenreinigern zu ermöglichen, hat die Deutsche Gesellschaft für Krankenhaushygiene e.V. (DGKH) im Jahr 2011 die Bildung einer Arbeitsgruppe mit dem Ziel beauftragt, geeignete Prüfmethode zu entwickeln und zu etablieren, mit denen die Wirksamkeit von Instrumentenreinigern quantitativ und mit guter Reproduzierbarkeit bestimmt werden kann.

Am 22. Juni 2011 fand die konstituierende Sitzung der Arbeitsgruppe Reinigungsmitteltestung (AG RMT) unter Leitung von Dr. Jürgen Gebel statt und nahm unmittelbar die Arbeit auf. Es wurden folgende Zielsetzungen (Primärziele) formuliert:

- Entwicklung einer Prüfmethode zur vergleichenden Beurteilung von Instrumentenreinigern für die manuelle Aufbereitung. Die Reinigerlösung soll in Wasser standardisierter Härte (WSH) angesetzt werden, die Prozesstemperatur soll 25 °C betragen → typische Bedingungen bei der manuellen Aufbereitung.
- Reinigertestung in einem Tauchverfahren, aufbauend auf den Arbeiten der *ad hoc*-Gruppe am DIN (NAMed 063-04-09) – publiziert durch Köhnlein *et al.* 2008 [14] und 2009 [15] → reproduzierbarer einfacher Aufbau, keine Mechanik.
- Prüfkörper auf der Basis von rostfreiem, austenitischem Stahl (1.4301) mit Oberflächenstrukturierung durch Längsschliff, 80er Körnung → Bezug zu metallischem, chirurgischem Instrumentarium.
- Prüfanschmutzung auf der Basis von koaguliertem Blut, Bezug zur Blutanschmutzung chirurgischer Realinstrumente → Blut mit hohen Anforderungen an Reinigungsprozesse, insbesondere nach Eintrocknung und/oder Denaturierung durch hohe Temperaturen und/

oder Einwirkung chemischer Agenzien.

- Auftragung einer flächendefinierten Prüfanschmutzungsmenge → Erzielung einer möglichst hohen Reproduzierbarkeit bei der Prüfkörperherstellung. Standardmäßig wurde die von Brill *et al.* 2014 [16] beschriebene Methode eingesetzt.
- Die Prüfmethode muss die Wirksamkeit von Instrumentenreinigern im Vergleich zu Wasser zeigen (Diskriminierungsfähigkeit der Methode) → WSH als Kontrolle.

Nach Etablierung einer Methode zur Erreichung der Primärziele soll die Methode angepasst werden, damit sie auch zur Beurteilung von Desinfektionsreinigern für die manuelle Instrumentenaufbereitung sowie von Reinigern für maschinelle Aufbereitungsprozesse eingesetzt werden kann.

Die AG RMT präsentiert mit dieser Publikation die Ergebnisse der Arbeitsgruppe, die in 18 Sitzungen und 10 Ringversuchen erzielt wurden. Teilnehmende Labore bei den Ringversuchen waren (alphabetisch):

- Dr. Brill + Partner GmbH Institut für Hygiene und Mikrobiologie, Hamburg
- HygCen GmbH, Schwerin
- Institut für Hygiene und Öffentliche Gesundheit (IHPH), Universitätsklinikum Bonn AÖR, Bonn
- Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt
- SMP GmbH, Tübingen
- wfk – Cleaning Technology Institute e.V., Krefeld

Die Reihenfolge der Aufzählung der Labore entspricht nicht der Darstellung in den Abbildungen.

■ 2. Material und Methoden

2.1 Lösungen und Geräte

- Schafblut heparinisiert mit 10 IE Heparin / ml. Es wurden Schafblute der Fa. Acila GmbH verwendet. Es wurden Gebindegrößen von 10 ml eingesetzt.
- Protaminhydrochlorid oder Protaminsulfat, zugegebene Menge 15 IE / ml Blut; das Produkt wurde vom Blutlieferanten oder aus örtlichen Apotheken bezogen.
- Gesättigte hygroskopische Salzlösungen aus i) Kaliumcarbonat, K_2CO_3 , ii) Natriumiodid, NaI, iii)

Natriumchlorid, NaCl, iv) Ammoniumsulfat, $(NH_4)_2SO_4$. Zur Herstellung wurden 1000 ml VE-Wasser auf 80 °C erwärmt und unter Rühren wurde so viel des jeweiligen Salzes zugegeben, bis unlösliche Rückstände am Boden verblieben. Durch Abkühlung auf Raumtemperatur (RT) nahm der präzipitierte Anteil zu.

- VE-Wasser, Leitwert $\leq 15 \mu S$
- HPLC-Wasser (z.B. Fa. Carl Roth, ROTISOLV® HPLC gradient grade, Bestell-Nr.: A511.3)
- WSH (Wasser standardisierter Härte) mit einer Härte von 376 ppm, bezogen auf $CaCO_3$ [17]
- Testreiniger 1 (TR-1): Alkalischer Reiniger zur manuellen Reinigung von Medizinprodukten mit Alkalispendern, Komplexbildnern, Dispergiermitteln, Lösungsvermittlern, oberflächenaktiven Stoffen und Netzmitteln, pH = 11,7 bei 1 % Konzentration, 20 °C.
- Testreiniger 2 (TR-2): Multienzymatischer Reiniger für die manuelle Reinigung von Medizinprodukten mit Proteasen, Lipasen und Amylasen, mit 5 – 15 % nichtionischen Tensiden, < 5 % anionischen Tensiden, Konservierungsmitteln, pH = 8,4 – 8,6 bei 0,1 – 3 % Konzentration, 20 °C.
- Stahlplättchen: Stahlplättchen der Charge 1 hatten die Abmessung von 77 x 26 x 1 mm; Stahlplättchen der Charge 2 von 80 x 12 x 1 mm. Die Kanten waren mit einem Radius von 2 mm gerundet. Die Stahlplättchen bestanden aus Edelstahl 1.4301. Die anzuschmutzende Oberfläche wies eine mit 80er Körnung längs bearbeitete Oberflächengüte auf (Bezug z.B. von Fa. Gerätetechnik BrieseLang GmbH oder Fa. JÜLEX Edelstahl / JÜLEX Maschinenbau Ing. Jürgen Lemke e.K. GmbH).
- Auftrageschablone, angepasst nach [16]: Es wurden Auftrageschablonen aus gefrästem Polycarbonat bzw. durch 3D-Druck hergestellte Auftrageschablonen aus Nylon (z.B. von Fa. 3D Activation GmbH) mit den passenden Abmessungen zur Aufnahme von Stahlplättchen der Charge 1 und Charge 2 verwendet. Die Auftrageschablonen ermöglichten bei Stahlplättchen der Charge 1 die Anschmutzung einer Fläche von 3,0 cm² und bei Stahlplättchen der Charge 2 von 6,0 cm².

- Decon 90, Decon Laboratories Limited, Hove, East Sussex, UK
- Isopropanol, 99,95 % (z.B. Fa. Carl Roth, Bestell-Nr.: AE73.2)
- Plastikdosen, dicht schließend (z.B. Fa. Lock & Lock, Typ HPL 834, 3,9 l, 295 x 230 x 84 mm)
- Exsikkator (z.B. Fa. Lab Companion, Cubic Vacuum Desiccator, Model VDC-11)
- Bechergläser: 250 ml, niedrige Form, Höhe ca. 95 mm, Außendurchmesser ca. 70 mm (z.B. Fa. Carl Roth, Bestell-Nr.: X691.1)
- Klemmen zur Fixierung von Prüfkörpern, korrosionsfest (z.B. Fa. PutzkULT GmbH, Bestell-Nr.: 607122)
- Rührfisch mit einer Länge von 35 mm und einem Durchmesser von 6 mm (z.B. Fa. Carl Roth, Bestell-Nr.: 1292)
- Magnetrührer mit 350 U / min (laborabhängig verschiedene Fabrikate)
- Petrischalen, 92 mm Durchmesser (z.B. Sarstedt, Bestell-Nr.: 82.1473)
- Glasperlen, 3 mm Durchmesser (z.B. Fa. A. Hartenstein, Bestell-Nr.: GP3)
- Horizontalschüttler mit 300 U / min (laborabhängig verschiedene Fabrikate)
- Glasschraubröhrchen, Außendurchmesser 16 mm, Höhe 100 mm mit Schraubdeckel (z.B. Fa. A. Hartenstein, Bestell-Nr.: RG10)
- Schraubröhrchen, 15 ml mit Schraubdeckel (z.B. Sarstedt, Bestell-Nr.: 62.554.502)
- BCA-Kit (z. B. ThermoFisher Scientific, Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Bestell-Nr.: 23225).
- Chemikalien für die OPA-Methode, nach [18].
- Acrylamid-Gele (z.B. Carl Roth Roti®-PAGE Gradient 4 – 20 %, Best.-Nr.: 2843.2)
- Protein-Ladepuffer (z.B. Carl Roth Roti®-Load 1, Best.-Nr.: K929.1)
- Protein-Größenstandard (z.B. Carl Roth Roti®-Mark PRESTAINED, Best.-Nr.: T852.1)

2.2 Methoden

2.2.1 Vorreinigung von Materialien

Zur gründlichen Reinigung der Stahlplättchen wurden sichtbare Anschmutzungen zunächst unter fließendem Wasser, ggf. unter Einsatz einer weichen Bürste, entfernt. Danach wurden

etwa je 30 Stahlplättchen in ein Becherglas (500 ml), das mit 400 ml 5 % Decon 90-Lsg. gefüllt war, gegeben und für ca. 10 min aufgeköcht. Die Decon 90-Lsg. wurde abgegossen und die Stahlplättchen unter fließendem Wasser gespült, bis keine Schaumbildung mehr erkennbar war. Die Stahlplättchen wurden einzeln mit einer Pinzette durch 5maliges Eintauchen in 70 % Isopropanol gespült und luftgetrocknet. Die zur Elution eingesetzten Glaskugeln wurden auf gleiche Weise in Decon 90-Lsg. gereinigt, danach in ein Becherglas mit 250 ml Isopropanol überführt und für ca. 2 min unter Schwenken inkubiert, danach dekantiert, in einem Sieb aufgefangen und getrocknet.

2.2.2 Herstellung von Blut-Prüfkörpern

Für die Herstellung von Blut-Prüfkörpern (B-PCD) wurden Stahlplättchen der Charge 1 verwendet. Die gereinigten Stahlplättchen wurden unter Verwendung der passenden Auftrageschablone, die die Anschmutzung einer Fläche von 3,0 cm² erlaubte, mit jeweils 50 µl reaktiviertem Schafblut angeschmutzt. Eine detaillierte Beschreibung zur flächendefinierten Anschmutzung ist in [16] zu finden. Für einen Ansatz wurde 900 µl heparinisierendes Schafblut mit 100 µl HPLC-Wasser und mit der entsprechenden Menge Protamin versetzt, durchmischt und unmittelbar die Anschmutzung von maximal 10 Stahlplättchen vorgenommen. Restliches Blut wurde verworfen. Die angeschmutzten Stahlplättchen wurden zur konditionierten Trocknung unmittelbar in einen Exsikkator eingebracht. Zur Erzielung unterschiedlicher definierter Luftfeuchten im Exsikkator wurde mindestens 24 h vor Konditionierungsbeginn der angeschmutzten Stahlplättchen die am Boden des Exsikkators befindliche Schale mit etwa 300 ml (vollständige Bedeckung der Schale) der jeweiligen gesättigten Salzlösung eingebracht.

2.2.3 Herstellung von Fibrin-Prüfkörpern

Für die Herstellung von Fibrin-Prüfkörpern (F-PCD) wurden Stahlplättchen der Charge 2 verwendet. Die gereinigten Stahlplättchen wurden unter Verwendung der passenden Auftrageschablone, die die Anschmutzung einer Fläche von 6,0 cm² erlaubte, mit jeweils 100 µl reaktiviertem unverdünnten Schafblut angeschmutzt [16]. Für

einen Ansatz wurde 1 ml heparinisierendes Schafblut mit der entsprechenden Menge Protamin versetzt, durchmischt und unmittelbar die Anschmutzung von maximal 10 Stahlplättchen vorgenommen. Restliches Blut wurde verworfen. Die angeschmutzten Stahlplättchen wurden unmittelbar in einen Exsikkator überführt, dessen Einlegeschale am Boden mit ca. 300 ml VE-Wasser gefüllt war, sodass die Inkubation in einer Atmosphäre mit 100 % rel. Feuchtigkeit erfolgte. Es erfolgte eine Inkubation für 1 h, um die vollständige Koagulation des reaktivierten Schafbluts zu ermöglichen. Die Stahlplättchen mit der feuchten Blutanschmutzung wurden entnommen und das Hämoglobin der Blutanschmutzung durch eine „De-Hämoglobinisierungs-Behandlung“ entfernt. Hierzu wurden jeweils 3 Stahlplättchen in ein Becherglas so an der Wand anliegend eingestellt, dass die angeschmutzte Seite zum Inneren des Becherglases wies. Das Becherglas wurde mit 250 ml VE-Wasser gefüllt und dieses mittels Rührfisch bei einer Umdrehungsgeschwindigkeit von 350 U / min durchmischt. Die De-Hämoglobinisierung erfolgte bei 22 ± 2 °C. Es erfolgte eine Inkubation für 10 min, danach wurde das VE-Wasser verworfen und frisches VE-Wasser eingefüllt. Es folgten weitere Waschschritte mit einer Inkubationsdauer von 10 min und 15 min, danach wurde nochmals frisches VE-Wasser eingefüllt und eine Inkubation über Nacht (17 – 20 h) unter ständigem Rühren vorgenommen. Die Prüfkörper wurden aus dem Becherglas entnommen, durch senkrechtes Halten möglichst viel Wasser entfernt und in eine Plastikdose eingebracht, deren Boden mit 300 g getrocknetem Silicagel gefüllt war. Es wurden bis zu 40 Prüfkörper auf dem siebförmigen Zwischenboden aufgelegt und die Prüfkörper getrocknet, bis die Fibrinschicht durch einen Übergang von opakem zu weißem Erscheinungsbild die Trocknung anzeigte. Die Trocknung erfolgte bei 22 ± 2 °C. Zur Lagerung wurden die fertigen F-PCD entnommen, einzeln in Glasschraubröhrchen eingebracht und im Kühlschrank bei 2 - 8 °C für maximal 4 Wochen gelagert. Vor den Reinigungsexperimenten wurden gelagerte F-PCD zunächst auf Raumtemperatur gebracht, bevor die Glasschraubröhrchen geöffnet wurden, um Kondensationseffekte auf der Prüfanschmutzung zu vermeiden.

2.2.4 Durchführung von Reinigungs-experimenten

Die Reinigerlösung (WSH, Testreiniger 1 oder 2) wurde in einer Glasflasche im Wasserbad auf 25 ± 2 °C vorwärmert. In Abhängigkeit der Messzeitpunkte wurden drei oder vier Prüfkörper mit der Prüfanschmutzung zum Zentrum des Becherglases orientiert an die Wand des Becherglases angelegt und am Rand des Becherglases mit einer Klammer so fixiert, dass die Prüfanschmutzung vollständig in die Reinigerlösung eintauchte. Die Anordnung der Prüfkörper im Becherglas erfolgte mit jeweils gleichen Abständen zueinander. Pro Reinigungsansatz (Becherglas mit Prüfkörpern) wurde ein unbehandelter Prüfkörper als Positivkontrolle mitgeführt. Der Testaufbau wurde auf einen Heiz-/Magnetrührer gestellt, die Umdrehungsgeschwindigkeit wurde auf 350 U / min adjustiert und die Temperatur so eingestellt, dass über die gesamte Versuchsdauer von bis zu 30 min die Temperatur von 25 ± 2 °C konstant eingehalten wurde. Eine ständige Kontrolle erfolgte mittels eingehängtem Thermometer. Nach Einfüllen von 250 ml Reinigerlösung wurde eine Stoppuhr gestartet. Nach 5 min, 10 min, 20 min und 30 min wurde je ein Prüfkörper entnommen, dieser wurde für ca. 1 sec in VE-Wasser eingetaucht („eindippen“) und danach zur Elution von Restanschmutzungen weiter verarbeitet.

2.2.5 Elution von Restanschmutzungen auf Blut-Prüfkörpern

Zur Elution von Rückständen reaktivierten Schafbluts auf B-PCD wurden die Prüfkörper in eine Petrischale (D: ca. 90 mm) überführt, die mit 16 g gereinigten Glasperlen und 10 ml 1 % SDS-Lsg. (pH = 11) gefüllt war. Die Prüfkörper wurden mit der angeschmutzten Seite auf den Glaskugeln platziert und für 20 min auf einem Horizontalschüttler bei 300 U / min bei RT eluiert. Das Eluat wurde mit einer Pipette in ein 15 ml Schraubröhrchen für die nachfolgende Bestimmung des Restproteingehalts überführt.

2.2.6 Elution von Restanschmutzungen auf Fibrin-Prüfkörpern

Zur Elution von Fibrinrückständen auf F-PCD wurde jeweils ein Prüfkörper in ein Glasschraubröhrchen überführt, es wurden 10 ml 1 % SDS-Lsg. (pH = 11) hinzu pipettiert und das Röhrchen mit lose aufgelegtem Deckel autoklaviert,

hierzu wurde ein Dampfsterilisationsprogramm mit 121 °C und einer Haltezeit von 20 min eingestellt. Um einen Siedeverzug beim Abkühlen zu verhindern, wurde, sofern verfügbar, ein Verfahren mit Stützdruck bei der Abkühlung verwendet. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurden die Glasschraubröhrchen dicht geschlossen und mit der Hand durch Schütteln durchmischt. Es erfolgte eine visuelle Kontrolle, dass keine Rückstände der Prüfanschmutzung auf den Prüfkörpern verblieben waren, im Zweifelsfall wurde eine Anfärbung von Proteinrückständen mittels Amidoschwarz [19] durchgeführt.

2.2.7 Proteinquantifizierung

Die Quantifizierung solubilisierter Proteine in den Eluaten kann sowohl mittels BCA- als auch OPA-Methode erfolgen. Hinsichtlich der Anwendung der BCA- oder OPA-Methode wird auf Anlage 8 zur Leitlinie von DGKH, DGSV, DGVS, DEGEA und AKI [18] und DIN EN ISO 15883-1 [7] verwiesen. Alternativ können modifizierte Methoden oder kommerzielle Testsätze verwendet werden, sofern diese auf den gleichen chemischen Nachweisreaktionen beruhen und eine gleichartige Eignung zur Proteinquantifizierung nachgewiesen wurde. Gegebenenfalls sind spezifische Bestimmungsgrenzen und Störfaktoren zu beachten. Die Kalibrierung der Methoden erfolgt mit definierten Mengen von bovinem Serum Albumin (BSA), Fraktion V. Zur Proteinquantifizierung der hier dargestellten Ringversuchsergebnisse wurde von den teilnehmenden Laboren stets die modifizierte OPA-Methode [20] angewandt.

2.2.8 Gelelektrophoretische Untersuchung von Fibrin in Eluaten

Zur Charakterisierung der durch Dampfsterilisation (121 °C, 20 min) solubilisierten Fibrinrückstände wurden Fibrinkoagel hergestellt, indem 250 µl Schafblut in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit der entsprechenden Menge Protamin versetzt wurde. Nach Abschluss der Koagulation (1 h) erfolgte eine De-Hämoglobinisierung von fünf Fibrinkoageln durch Waschung in 500 ml VE-Wasser. Innerhalb der ersten 8 h der De-Hämoglobinisierung wurde das VE-Wasser 3x ge-

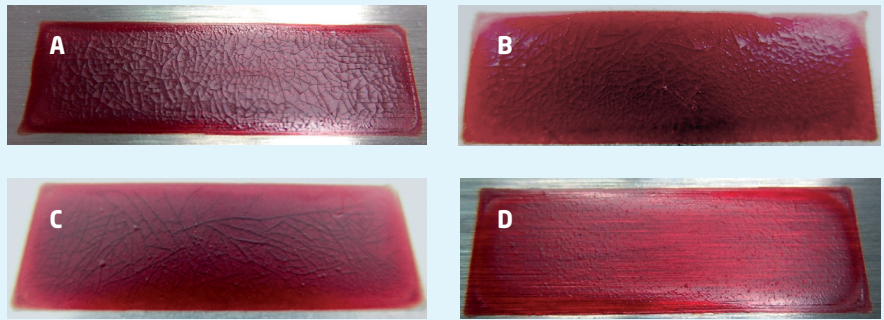


Abb. 1: Konditionierung von Blutprüfkörpern (B-PCD) bei 22 - 24 °C bei unterschiedlichen relativen Luftfeuchten über eine Dauer von 22 ± 2 h. Konditionierung: A) 43% r. F. über K₂CO₃-Lsg.; B) 70 % r. F. über KI-Lsg.; C) 75% r. F. über NaCl-Lsg.; D) 81% r. F. über (NH₄)₂SO₄-Lsg.

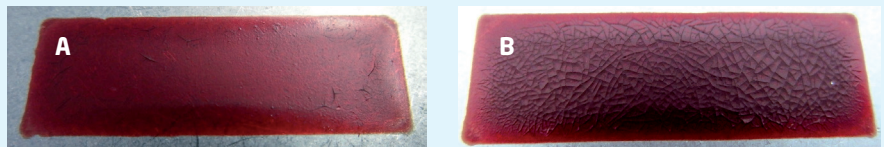


Abb. 2: B-PCD wurden bei 81 % r. F. über (NH₄)₂SO₄-Lsg. konditioniert, hierbei wurde eine homogene, getrocknete Blutanschmutzung erzielt (A). Bei Inkubation an der Raumluft (24 °C, 49 % r. F.) trat innerhalb kurzer Zeit (< 5 min) eine starke Rissbildung auf (B).

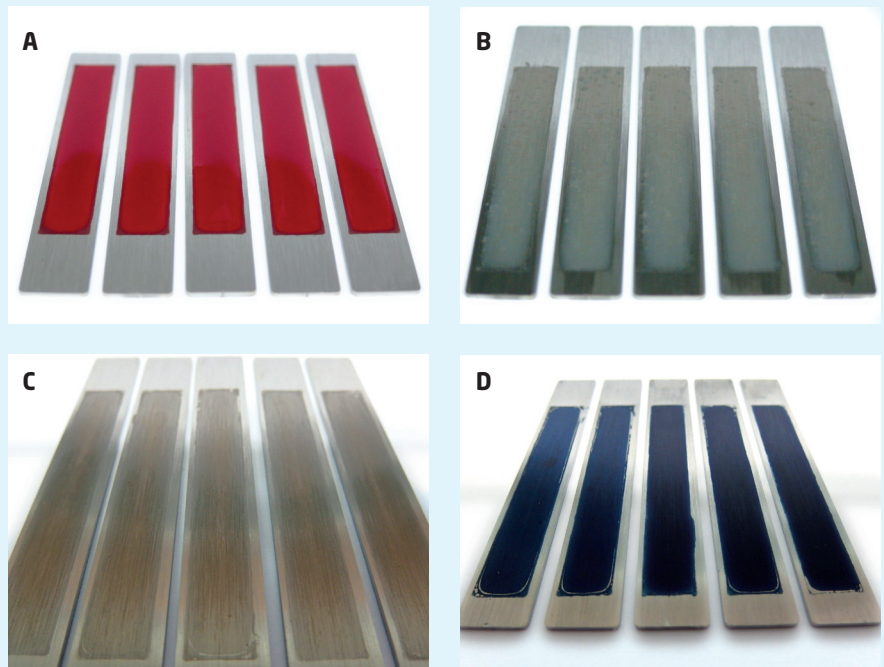


Abb. 3: Schritte der Herstellung von F-PCD: A) mit 100 µl unverdünntem, reaktiviertem Blut homogen beschichtete Stahlplättchen (Charge 2, Größe: 80 x 12 x 1 mm, angeschmutzte Fläche 6 cm²) nach einstündiger Inkubation bei 100% r. F.; B) nasse F-PCD unmittelbar nach dem De-Hämoglobinisierungsschritt, das gequollene Fibrin-Hydrogel weist ein opakes Erscheinungsbild auf; C) F-PCD nach 24 h Trocknung über Silicagel; D) getrocknete F-PCD nach Anfärbung der Fibrinschicht mit Amidoschwarz.

wechselt, danach erfolgte ein täglicher Wechsel über eine Gesamtzeit von 4 Tagen. 2 Fibrinkoagel wurden in einem Glasschraubröhrchen mit 0,25 ml 1 % SDS-Lsg. (pH = 11) überschichtet und durch Dampfsterilisation in die solubilierte Form (Eluat) überführt. 10 µl des Eluats wurden mit 3,4 µl Proteinladepuffer vermischt, für 10 min aufgeköcht und auf ein Acrylamidgel (4 – 20 % Gradientengel) zusammen mit einem Proteingrößenmarker aufgetragen. Die Anfärbung erfolgte mittels Coomassie-Färbung [21].

2.2.9 Total Organic Carbon-Messungen

Die Messungen des Total Organic Carbon (TOC) erfolgten mit dem System DIMATOC 2010-LC (DIMATEC Analyentechnik GmbH, Essen), einem Kompakt-Laboranalysator zur Kohlenstoffbestimmung in Flüssigkeiten nach dem Prinzip der thermisch-katalytischen Oxidation bei 850 °C mit anschließender NDIR Detektion (nicht-dispersive Infrarotspektroskopie). Die Elution der Restanschmutzung auf F-PCD für diese Messungen erfolgte, wie in 2.2.6 beschrieben, durch Dampfsterilisation bei 121 °C und 20 min Haltezeit, jedoch mit einer 0,001 N NaOH-Lsg. anstelle der 1 % SDS-Lsg. Es konnten danach keine Rückstände auf den F-PCD durch Anfärbung mit Amidoschwarz festgestellt werden. Bei der direkten Messung des TOC der erhaltenen Lösung wird gelöstes und zu Natrium(hydrogen)carbonat umgesetztes Kohlendioxid miterfasst. Daher wurden die Lösungen mit Salzsäure angesäuert, Kohlendioxid-freies Trägergas 5 min durch die Lösung zum Ausgasen des Kohlendioxids geleitet und dann ein Aliquot der TOC-Messung zugeführt. Die Messwerte dieser NPOC (non purgeable organic carbon)-Messung lagen dann im Mittel um 22 µg Kohlenstoff / ml niedriger gegenüber der direkten TOC-Messung.

3. Ergebnisse

3.1 Herstellung homogener reproduzierbarer Prüfanschmutzungen

Unter Verwendung einer Prüfanschmutzung aus reaktiviertem verdünnten Schafblut wurden Prüfkörper mit einer Blutanschmutzung (B-PCD) hergestellt. Publierte Methoden zur konditionierten Trocknung von Blutanschmutzungen [14, 15] bei 43 % relativer Feuchte (r. F.) führten bei den teilnehmenden Laboren zu unterschiedlichen Ergebnis-

sen. Es wurden sowohl homogene, fest anhaftende Anschmutzungen als auch stark rissige Anschmutzungen beobachtet, die eine Ablösung von der Prüfkörperoberfläche bei mechanischer Erschütterung zeigten. Zur Optimierung der Konditionierungsmethode wurden Versuche in mehreren Laboren über unterschiedlichen gesättigten Salzlösungen [22] durchgeführt. Die vergleichenden Konditionierungen erfolgten für 22 ± 2 h bei 43 % r. F. über gesättigter K_2CO_3 -Lsg., bei 70 % r. F. über gesättigter KI-Lsg., bei 75 % r. F. über gesättigter NaCl-Lsg. und bei 81 % r. F. über gesättigter $(NH_4)_2SO_4$ -Lsg. Die teilnehmenden Labore konnten trotz mehrfach wiederholter Versuche unter sonst im Labor konstanten Bedingungen (Temperatur, Blutmenge und -konzentration, etc.) keine einheitlich geeignete Luftfeuchte zur reproduzierbaren Erzielung homogener getrockneter und fest anhaftender Blutanschmutzungen auf Stahloberflächen ermitteln. Eine exemplarische Bildzusammenstellung unterschiedlich konditionierter Blutanschmutzungen (Labor A) ist in Abb. 1 dargestellt.

Bei weiteren Experimenten zeigte sich, dass, sofern es gelang, durch Konditionierung eine getrocknete homogene Blutanschmutzung herzustellen (s. Abb. 2A), eine nachfolgende kurzzeitige Inkubation (2-5 min) der Prüfkörper an der Raumluft des Labors (24 °C, 49 % r. F.) eine schnelle Ausbildung von Rissen in der Anschmutzungsschicht und ggf. eine Ablösung der Blutanschmutzung von der Stahloberfläche bedingte (s. Abb. 2B). Muthmaßlich führte eine weitere Trocknung der bei 81 % r. F. konditionierten Blutanschmutzung zu Schrumpfrissen. Diese Instabilität der Blutanschmutzung erschwerte den reproduzierbaren Einsatz von B-PCD.

Durch die Entwicklung von F-PCD konnte die Problematik der konditionierten Trocknung der aufgetragenen Blutanschmutzung umgangen werden, indem die Koagulation des Blutes in einer gesättigten wasserhaltigen Atmosphäre (100% r. F., Inkubation über VE-Wasser) erfolgte und die nassen, koagulierten Prüfkörper direkt dem nachfolgenden De-Hämoglobinisierungsschritt zur Entfernung des Hämoglobins und weiterer wasserlöslicher Proteinkomponenten zugeführt wurden. Eine unmittelbar anschließende Trocknung der Prüfanschmutzung über Silicagel

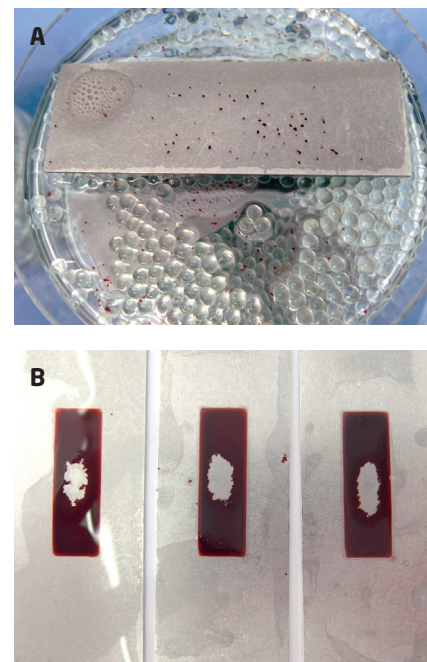


Abb. 4: Visualisierung der mechanischen Entfernung und Suspension wasserunlöslicher Anschmutzungsrückstände von B-PCD. Die Einwirkung eines desinfizierend wirkenden Reinigers führte zur Denaturierung der Blutanschmutzung, welche durch submerses (1 % SDS-Lsg. [pH = 11]) Schütteln auf Glaskugeln nur mechanisch entfernt und suspendiert werden konnte (A). Auf der Oberfläche der behandelten Prüfkörper war eine räumlich begrenzte Ablösung der Anschmutzungsschicht durch mechanische Einwirkung der Glasperlen zu beobachten (B).

führte zu einer homogenen und fest anhaftenden wasserunlöslichen Fibrinschicht, s. Abb. 3.

3.2 Solubilisierung/Elution von Anschmutzungsrückständen

Bei der Elution von in Reinigungsversuchen eingesetzten B-PCD wurde von den teilnehmenden Laboren übereinstimmend beobachtet, dass es zu einer rein mechanischen Entfernung verbliebener Anschmutzungsrückstände von den Prüfkörpern durch die kreiselnd schüttelnde Bewegung auf den zugegebenen Glasperlen kam und unlösliche Anschmutzungsrückstände als suspendierte Flöckchen im Elutionsmedium verteilt vorlagen. Zur Visualisierung der Suspension unlöslicher Anschmutzungsrückstände zeigt Abb. 4 stellvertretend die Elution von B-PCD, die im Rahmen von Vorversuchen mit einem desinfizierend wirkenden Reiniger be-

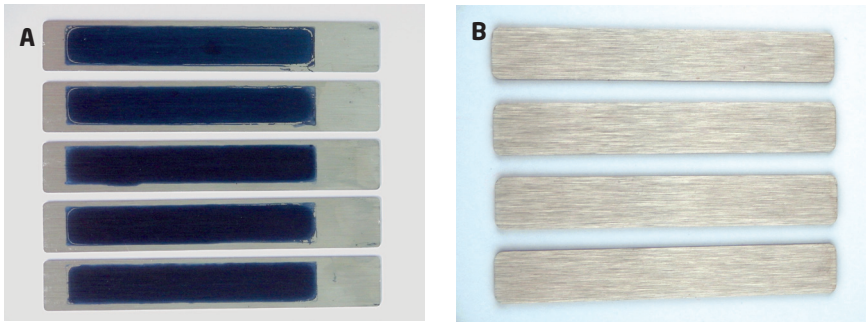


Abb. 5: F-PCD nach Anfärbung mit Amidoschwarz: A) unbenutzte F-PCD, die dem Elutionsschritt nicht unterzogen wurden; B) F-PCD nach thermischer Elution/Solubilisierung der Fibrinschicht mit einem Dampfsterilisationsschritt.

handelt worden waren. Dessen Einwirkung führte zu einer Denaturierung der Blutanschmutzung, sodass enthaltenes Hämoglobin nicht mehr wasserlöslich war, weshalb keine weiteren Versuche mit desinfizierend wirkenden Reinigern durchgeführt wurden. Bei Experimenten mit nicht desinfizierend wirkenden Reinigern wurden weißlich-farblose, jedoch mit Amidoschwarz anfärbbare Rückstände auf den Prüfkörpern beobachtet, die durch das Schütteln auf Glasperlen ebenfalls lediglich als unlösliche Flöckchen suspendiert werden konnten. Die Unlöslichkeit von Anschmutzungsbestandteilen wurde als kritisch hinsichtlich der Entnahme einer homogenen Messlösung sowie der nachfolgenden Proteinquantifizierung beurteilt.

Zur Elution der wasserunlöslichen Fibrinanschmutzung bei F-PCD wurde eine Methode zur quantitativen Solubilisierung durch Dampfsterilisation (121 °C / 20 min) bei submerser Inkubation in 1 % SDS-Lsg. (pH = 11) entwickelt. Dieses Verfahren führte zu einer restlosen Ablösung von Fibrinrückständen. Der Nachweis über die Vollständigkeit der Elution wurde durch Anfärbung möglicherweise verbliebener Fibrinrückstände durch Amidoschwarz geführt und ergab keine nachweisbaren Rückstände (Nachweisgrenze < 20 ng / cm² [19]), s. Abb. 5.

3.3 Einfluss des thermischen Elutionsverfahrens auf die Proteinquantifizierung

Da durch das Dampfsterilisationsverfahren eine starke Erhitzung der Fibrinrückstände in Gegenwart des alkalischen Mediums (1 % SDS-Lsg., pH = 11) erfolgte, muss sichergestellt werden, dass es zu keiner Partial- oder Totalhydrolyse der Fibrinrückstände kam, was zu einer starken Veränderung

der Anzahl freier α - und ϵ -Aminogruppen sowie Peptidbindungen geführt hätte, für die die OPA-, respektive die BCA-Methode, sensitiv ist. Darüber hinaus durfte keine Reaktion der vorliegenden Aminogruppen eintreten, da diese dann nicht mehr mittels OPA-Methode erfassbar wären. Zur Überprüfung wurden Vergleichsuntersuchungen unter Verwendung von definiert eingestellten Schafblutlösungen (5, 10, 25 μ l Blut / ml, mittels OPA-Methode bestimmte Proteinkonzentration des Bluts: 168,5 mg / ml) und von BSA (Typ V)-Lösungen definierter Konzentration (50, 100, 200 μ g / ml) und in 1 % SDS-Lsg. (pH = 11) durchgeführt. Es wurde eine direkte Proteinquantifizierung mittels OPA- und BCA-Methode der unbenutzten Lösungen (25 °C) durchgeführt. Eine zuvor abgetrennte Teilmenge der Schafblut- und BSA-Lösungen wurden einem Dampfsterilisationsschritt (121 °C, 20 min) unterzogen und die jeweiligen Proteingehalte nachfolgend ebenfalls mittels OPA- und BCA-Methode quantifiziert (n = 1), s. Abb. 6.

Für die unterschiedlich konzentrierten Blutlösungen wurden für die Behandlung bei 121 °C im Vergleich zur Lagerung bei 25 °C Unterschiede hinsichtlich des gemessenen Proteingehalts bei Anwendung der OPA-Methode von -10,0 % bis +10,6 % und bei Anwendung der BCA-Methode von -2,7 % bis +0,8 % ermittelt. Für die unterschiedlich konzentrierten BSA-Lösungen wurden Unterschiede bei Anwendung der OPA-Methode von -10,4 % bis -6,8 % und bei Anwendung der BCA-Methode von -9,1 % bis -7,1 % gemessen. Die als eher gering beurteilten Unterschiede wurden der methodischen Präzision der jeweiligen Proteinquantifizierungsmethode zugeschrieben.

3.4 Qualitative Charakterisierung solubilisierter Fibrinanschmutzungen

Um Information über die Größe der Fibrinbruchstücke nach der Elution zu erhalten, wurde eine Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (PAGE) durchgeführt, s. Abb. 7. Die durch die thermische Behandlung solubilisierten Fibrinbruchstücke lagen in einer sehr unterschiedlichen Größenverteilung zwischen ca. 17 kDa bis hin zu ca. 230 kDa vor. Der Großteil der Bruchstücke wurde zwischen ca. 20 – 70 kDa detektiert. Die thermische Behandlung vor der Elution führte zu keiner Totalhydrolyse des Fibrins. Es wurden unterschiedlich große Protein(fragmente) detektiert, die auf eine Partialhydrolyse hindeuteten, jedoch keinen relevanten Einfluss auf die Proteinquantifizierung mittels OPA- und BCA-Methode hatten, siehe 3.3.

3.5 Konstanz der Fibrinmenge auf Prüfkörpern unter Wiederhol- und Vergleichsbedingungen

Zur Untersuchung, ob F-PCD mit vergleichbaren Fibrinmengen in den unterschiedlichen Laboren ausgehend von einer Blut-Charge hergestellt werden können, bezogen fünf teilnehmende Labore Schafblut derselben Blutgewinnungs-Charge. Der Proteingehalt

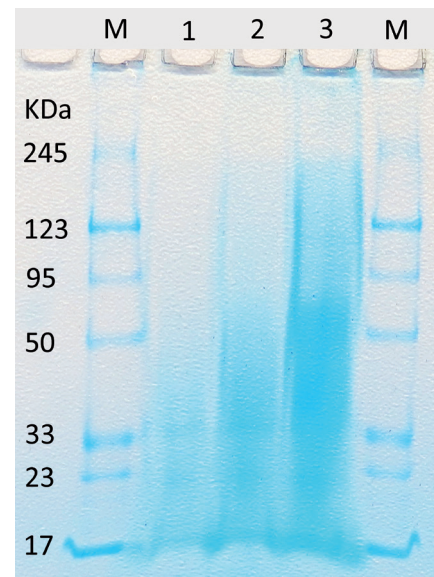


Abb. 7: Denaturierende Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (PAGE) von Fibrin, das durch einen Dampfsterilisationsschritt (121 °C, 20 min) solubilisiert wurde. M: Molekularer Größenmarker 17 – 245 kDa, 1: 5 μ l eines Fibrin-Solubilisats (nicht quantifiziert), 2: 10 μ l des Fibrin-Solubilisats, 3: 20 μ l des Fibrin-Solubilisats.

der verwendeten Blutcharge wurde von allen Laboren mittels OPA-Methode gemessen und lag bei $135 \pm 5,56 \text{ mg / ml}$ ($n = 16$, jeweils Einfach- oder Doppelbestimmung in den fünf Laboren). Die Herstellung der ersten Charge von F-PCD (Charge 1) erfolgte innerhalb von 24 h nach Lieferung bzw. innerhalb von 48 h nach Gewinnung des Schafbluts. Eine zweite unangebrochene Flasche des Schafbluts derselben Blutgewinnungs-Charge wurde in den jeweiligen Laboren gekühlt ($4 - 6 \text{ }^\circ\text{C}$) unter täglichem Schwenken gelagert. Nach sieben Tagen Lagerung wurde eine weitere Charge von F-PCD (Charge 2) hergestellt. Der Proteingehalt der F-PCD der Charge 1 und Charge 2 wurde nach Solubilisierung mittels der OPA-Methode bestimmt, die Ergebnisse sind in Tab. 1 dargestellt. Für die in den fünf Laboren untersuchten F-PCD ($n = 84$) wur-

de ein durchschnittlicher Proteingehalt von $686 \pm 156 \text{ } \mu\text{g / F-PCD}$ ermittelt, der Maximalgehalt betrug $984 \text{ } \mu\text{g / F-PCD}$, der Minimalgehalt $408 \text{ } \mu\text{g / F-PCD}$. Eine systematische Ab- oder Zunahme des messbaren Proteingehalts bedingt durch einwöchige Lagerung des Blutes vor Herstellung der F-PCD konnte nicht ermittelt werden, beobachtete Schwankungen wurden der Präzision der Proteinquantifizierungsmethode in den jeweiligen Laboren zugeschrieben.

3.6 Vergleichende Bewertung der Reinigung mittels Blutprüfkörper (B-PCD)

In einem Ringversuch zur vergleichenden Bewertung der Reinigung unter Verwendung von Blutprüfkörpern (B-PCD) nahmen vier Labore (Lab. A – D) teil. Nach einer Behandlungszeit von 5, 10 und 20 min wurden jeweils

Prüfkörper entnommen und hinsichtlich des Restproteingehaltes untersucht. Die Labore A, B, C führten zwei unabhängige Versuchsserien mit je $n = 3$ B-PCD pro Messpunkt durch (gesamt $n = 6$), Labor D führte eine einfache Versuchsserie mit $n = 3$ B-PCD pro Messpunkt durch. Die Quantifizierung des Restproteingehalts erfolgte immer unter Anwendung der OPA-Methode. Standardabweichungen für die Ergebnisse der jeweiligen Labore konnten nicht angegeben werden, da nur die arithmetischen Mittelwerte der Restproteingehalte von den Laboren mitgeteilt wurden.

Die unbehandelten Kontrollprüfkörper (0 min) wiesen einen Proteingehalt zwischen 8.430 und $13.682 \text{ } \mu\text{g / B-PCD}$ auf. Zur Normalisierung der Ergebnis-

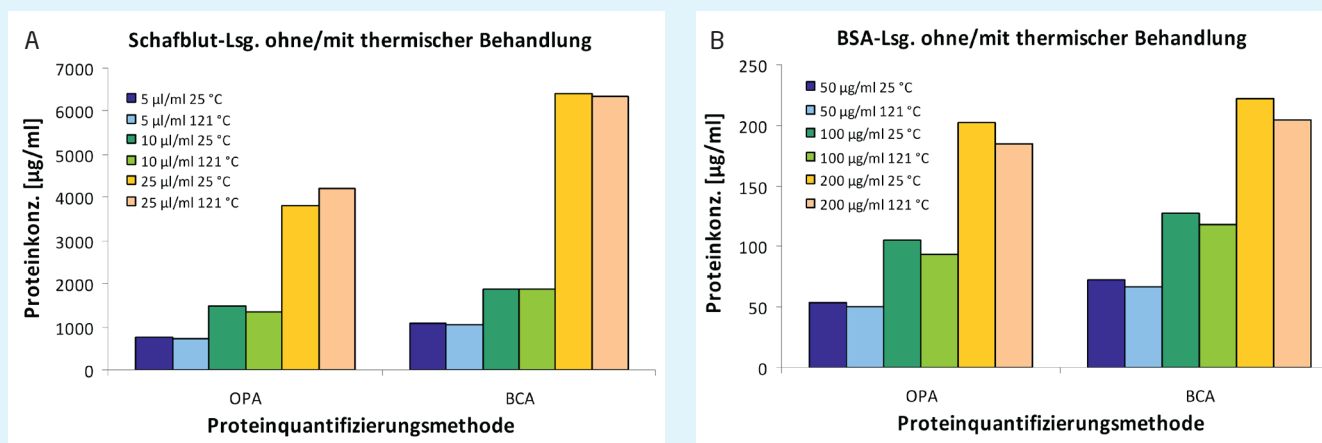


Abb. 6: Vergleichende Untersuchung des Einflusses einer thermischen Behandlung ($121 \text{ }^\circ\text{C}$, 20 min) im Vergleich zur Inkubation bei Raumtemperatur ($25 \text{ }^\circ\text{C}$) auf die mittels OPA- und BCA-Methode messbaren Proteinkonzentrationen unterschiedlicher Schafblut-Lösungen (A) und BSA-Lösungen (B) (je $n = 1$).

Labor	A		B		C		D		E	
Charge	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
n	9	9	9	9	9	9	9	9	6	6
Mittel [$\mu\text{g / F-PCD}$]	884	856	520	567	624	844	726	722	492	495
SD [$\mu\text{g / F-PCD}$]	59,2	33,3	39,0	24,8	111	52,9	94,0	73,3	27,6	11,0
SD-Prozent [%]	6,69	3,89	7,49	4,38	17,8	6,27	12,9	10,1	5,61	2,22

Tab. 1: Untersuchung der Konstanz der Fibrinmenge auf F-PCD. Die Labore A, B, C, D und E stellten zwei Chargen (Charge 1 und 2) F-PCD mit jeweils 6 - 9 Prüfkörpern her. Nach Solubilisierung der Fibrinansammlung erfolgte die Quantifizierung des Proteingehalts mittels OPA-Methode. Es ist jeweils die Anzahl der untersuchten F-PCD (n), das arithmetische Mittel (Mittel), die Standardabweichung (SD) und die prozentuale Standardabweichung (SD-Prozent) für die gemessenen Proteingehalte der unterschiedlichen F-PCD-Chargen in jedem Labor angegeben.

se wurden die bei den unterschiedlichen Messpunkten ermittelten Restproteingehalte auf die unbehandelten Kontrollprüfkörper (100 %) bezogen und der prozentuale Restproteingehalt angegeben. Die Ergebnisse für die Reinigungsexperimente unter Verwendung von WSH, Testreiniger 1 und 2 (TR-1, TR-2) sind in Abb. 8A, B, C gezeigt. Die Ergebnisse der teilnehmenden Labore wurden zusammengefasst und das arithmetische Mittel der Restproteingehalte zu den jeweiligen Messpunkten bestimmt, die Ergebnisse sind als Kinetik in Abb. 8D dargestellt.

Nach 5 min Behandlungszeit mit WSH wurde ein Restproteingehalt von $11,5 \pm 1,9$ % und für TR-1 und TR-2 von $6,7 \pm 4,3$ und $6,8 \pm 2,9$ % ermit-

telt. Nach 20 min lagen die Restproteingehalte für die Behandlung mit WSH bei $6,1 \pm 2,9$ % und für die Behandlung mit TR-1 und TR-2 bei $1,7 \pm 0,8$ % und $3,5 \pm 1,8$ %. Die Reinigungswirkung von WSH, TR-1 und TR-2 war aufgrund der vergleichbaren Entfernung der Blutanschmutzung nicht unterscheidbar.

3.7 Vergleichende Bewertung der Reinigung mittels Fibrinprüfkörper

An einem ersten Ringversuch unter Verwendung der neu entwickelten F-PCD nahmen sechs Labore (Labor A-F) teil. Die Reinigungswirkung von WSH, TR-1 und TR-2 wurden vergleichend untersucht. Aufgrund der schwierigen Entfernbarkeit der Fibrinanschmutzung wurden die Messpunkte auf 30 min er-

weitert. Die Labore A, B, E und F führten jeweils eine Versuchsserie mit je $n = 3$ F-PCD pro Messpunkt durch, Labor D setzte $n = 4$ F-PCD pro Messpunkt ein, Labor C setzte bei der Untersuchung mit WSH $n = 2$ F-PCD / Messpunkt und bei der Untersuchung mit TR-1 und TR-2 je $n = 3$ F-PCD / Messpunkt ein. Zur Elution von Anschmutzungsrückständen auf den F-PCD wurde die entwickelte Elutionsmethode unter Anwendung eines Dampfsterilisationsschritts angewendet. Die Quantifizierung der Restproteingehalte erfolgte entsprechend der Festlegung in allen Laboren mit der OPA-Methode, ermittelte Restproteingehalte wurden auf das Standardprotein BSA, Typ V, bezogen.

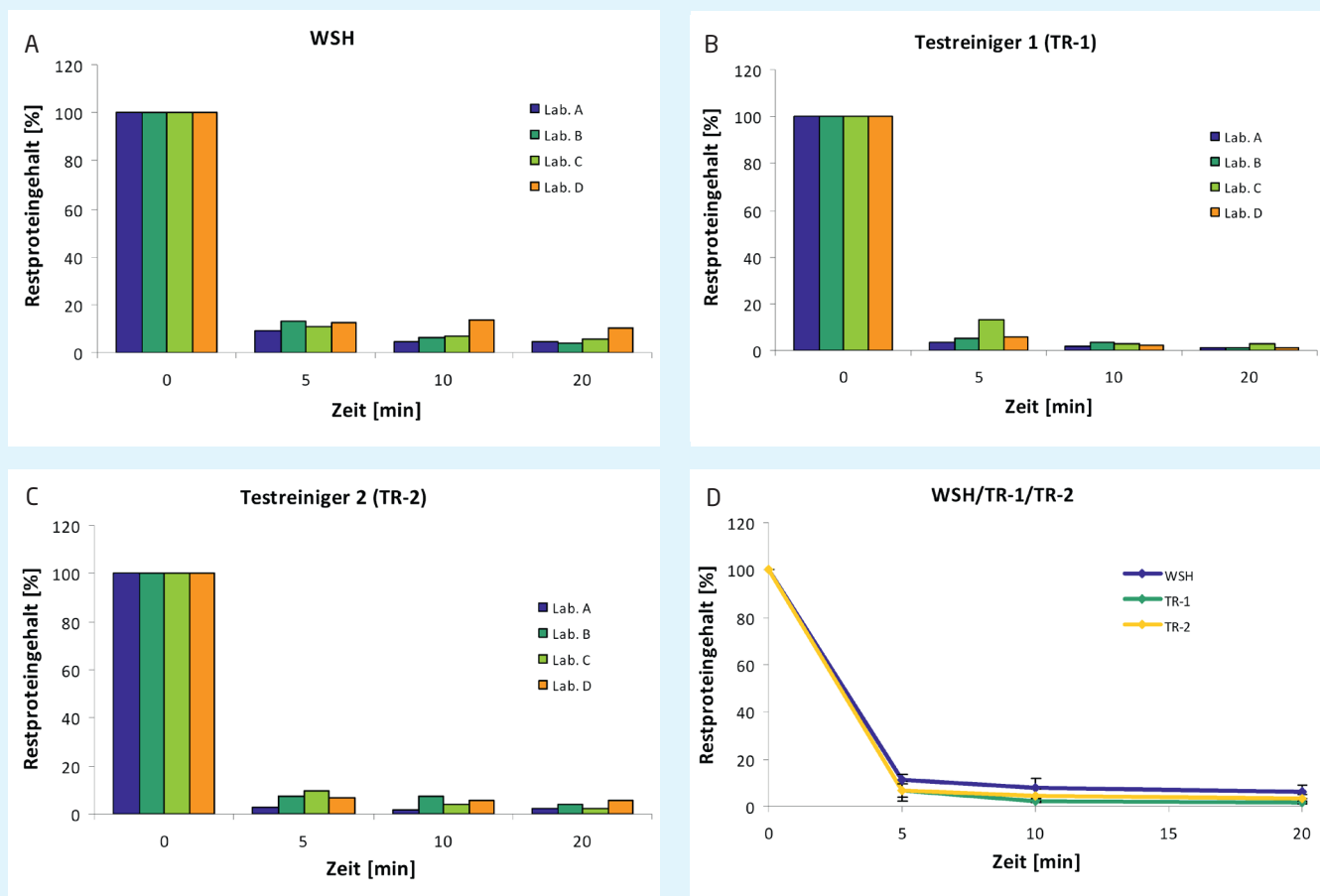


Abb. 8: Reinigungsversuche in WSH und zwei Testreinigern unter der Verwendung von Prüfkörpern mit reaktivierter Blutanschmutzung (B-PCD) in vier Laboren (Lab. A-D). Die Prüfkörper wurden unterschiedlich lange in der Reinigerlösung behandelt (5, 10, 20 min) und der verbliebene Restproteingehalt (Blutrückstände) nach Elution mittels OPA-Methode bestimmt. Die Labore A - C führten zwei Versuchsserien mit je $n = 3$ B-PCD / Messpunkt durch, Labor D führt eine Versuchsserie mit je $n = 3$ B-PCD / Messpunkt durch. Der Restproteingehalt ist als prozentualer Wert angegeben und wurde auf die unbehandelten Kontrollen (0 min) bezogen. A: Reinigung in WSH; B: Reinigung in Testreiniger 1 (TR-1); C: Reinigung in Testreiniger 2 (TR-2); D: Die von den Laboren mitgeteilten Restproteingehalte wurden zur Ermittlung des durchschnittlichen Restproteingehalts eingesetzt (Fehlerbalken: Standardabweichung, SD).

Die unbehandelten Kontrollprüfkörper (0 min, insgesamt n = 56) wiesen einen durchschnittlichen Proteingehalt von $625 \pm 175 \mu\text{g}$ (Minimum: $223 \mu\text{g}$, Maximum $962 \mu\text{g}$) / F-PCD auf. Zur Normalisierung der Ergebnisse wurden die bei den unterschiedlichen Messpunkten ermittelten Restproteingehalte auf die unbehandelten Kontrollprüfkörper (100 %) bezogen und der prozentuale Restproteingehalt angegeben. Die Ergebnisse für die Reinigungsexperimente unter Verwendung von WSH, TR-1 und TR-2 sind in Abb. 9A, B, C gezeigt. Die Ergebnisse der teilnehmenden Labore wurden zusammengefasst und das arithmetische Mittel der Restproteinge-

halte zu den jeweiligen Messpunkten bestimmt, die Ergebnisse sind als Kinetik in Abb. 9D dargestellt.

Eine unterschiedliche Reinigungswirkung von WSH, TR-1 und TR-2 konnte ab einer Reinigungszeit von 10 min festgestellt werden; hier lag der prozentuale Restproteingehalt für eine Reinigung mit WSH bei $81,8 \pm 8,9 \%$ (n = 18), mit TR-1 bei $59,9 \pm 7,5 \%$ und mit TR-2 bei $26,7 \pm 23,0 \%$ (je n = 19). Bei TR-2 wurde für längere Reinigungszeiten (30 min) eine weitere Reduktion des Restproteingehalts auf $5,7 \pm 5,8 \%$ beobachtet, während bei einer Reinigung in WSH und TR-1 lediglich eine

geringfügige weitere Abnahme des Restproteingehaltes beobachtet wurde, s. Abb. 9D.

Um eine weitere Standardisierung des Fibringehalts auf den F-PCD und den Einfluss einer unterschiedlichen Lagerungsdauer des für die Anschmutzung eingesetzten Schafbluts zu untersuchen, wurde von der Arbeitsgruppe ein weiterer Ringversuch durchgeführt. Dabei bezogen die Labore A - F heparinisiertes Schafblut einer einzigen Blutgewinnungs-Charge. Innerhalb von 24 h nach Lieferung des Blutes wurde eine erste Charge F-PCD her-

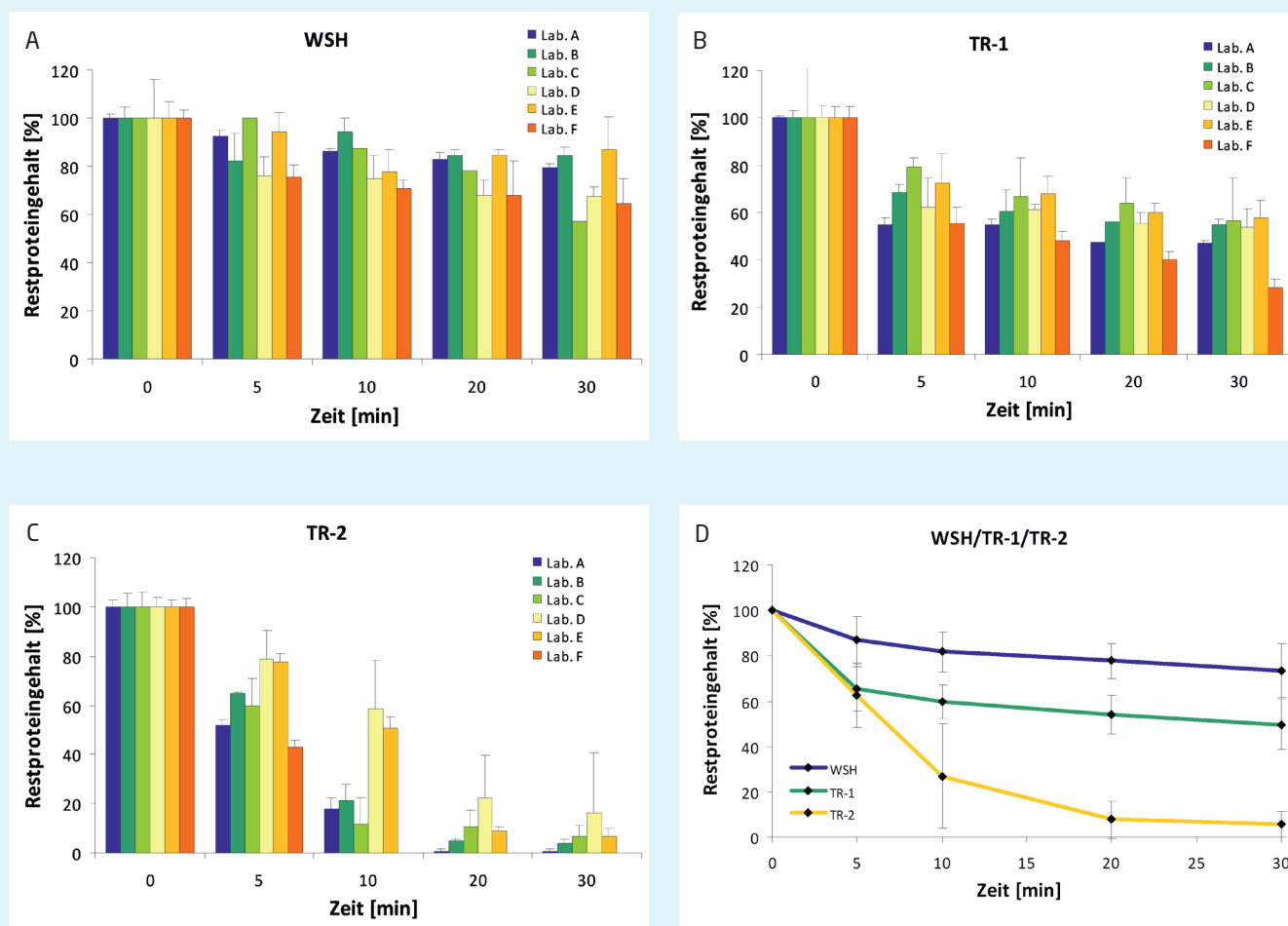


Abb. 9: Reinigungsversuche in WSH und zwei Testreinigern unter der Verwendung von Prüfkörpern mit Fibrinanschmutzung (F-PCD) in sechs Laboren (Lab. A-F). Die Prüfkörper wurden unterschiedlich lange in der Reinigerlösung behandelt (5, 10, 20, 30 min) und der verbliebene Restproteingehalt (Fibrin) nach Elution mittels OPA-Methode bestimmt. Die Labore A, B, E und F führten eine Versuchsserie mit je n = 3 F-PCD / Messpunkt durch, Labor D setzte n = 4 F-PCD / Messpunkt ein, Labor C setzte bei der Prüfung mit WSH n = 2 F-PCD / Messpunkt ein, sonst n = 3. Die Angabe des ermittelten Restproteingehalts erfolgte als prozentuale Angabe und wurde auf die unbehandelten Kontrollen (0 min) bezogen. A: Reinigung in WSH; B: Reinigung in Testreiniger 1 (TR-1); C: Reinigung in Testreiniger 2 (TR-2); D: Die von den Laboren mitgeteilten Restproteingehalte wurden zur Ermittlung des durchschnittlichen Restproteingehalts eingesetzt (Fehlerbalken: Standardabweichung, SD).

gestellt. Eine zweite unangebrochene Flasche des Schafbluts derselben Herstellungs-Charge wurde in den jeweiligen Laboren gekühlt (4 – 6 °C) unter täglichem Schwenken gelagert. Nach sieben Tagen Lagerung wurde eine zweite Charge F-PCD hergestellt. Die Labore führten vergleichende Reinigungsversuche mit F-PCD der Charge 1 und Charge 2 mit WSH, TR-1 und TR-2 durch. Für jeden Messpunkt (0, 5, 10, 20, 30 min) und jede PCD-Charge wurden jeweils n = 3 F-PCD untersucht.

Da die Labore D und E eine Charge des TR-2 jenseits des Haltbarkeitsdatums einsetzten, wiederholten diese beiden Labore die Reinigungsexperimente mit F-PCD, die mit einer anderen Blut-Charge hergestellt worden waren.

Die Ergebniskonsistenz wurde durch Kontrollen (Reinigungsexperimente mit WSH) und übereinstimmende Ergebnisse gewährleistet.

Die unbehandelten Kontrollprüfkörper (0 min, insgesamt n = 36 F-PCD) wiesen bezogen auf die jeweilige Herstellungs-Charge (arithmetisches Mittel aus n = 3 F-PCD) einen Proteingehalt zwischen 487 und 915 µg / F-PCD auf. Die normalisierten Ergebnisse für die Reinigungsexperimente unter Verwendung von WSH, TR-1 und TR-2 sind in Abb. 10A, B, C gezeigt. Die Ergebnisse der teilnehmenden Labore wurden zusammengefasst und das arithmetische Mittel der Restproteingehalte zu den jeweiligen Messpunkten bestimmt, die

Ergebnisse sind als Kinetik in Abb. 10D dargestellt.

In guter Übereinstimmung zum vorhergehenden Ringversuch konnten bereits nach einer Reinigungszeit von 10 min deutliche Unterschiede hinsichtlich des gemessenen Restproteingehalts für die Reiniger WSH, TR-1 und TR-2 ermittelt werden, wenngleich auch in diesem Ringversuch die Standardabweichungen Überlappungen für die unterschiedlichen Produkte zeigten. Bei einer Reinigungszeit von 20 min wurde eine noch deutlichere Differenzierung im Vergleich zu kürzeren Reinigungszeiten zwischen den drei Produkten ermittelt. Unterschiede hinsicht-

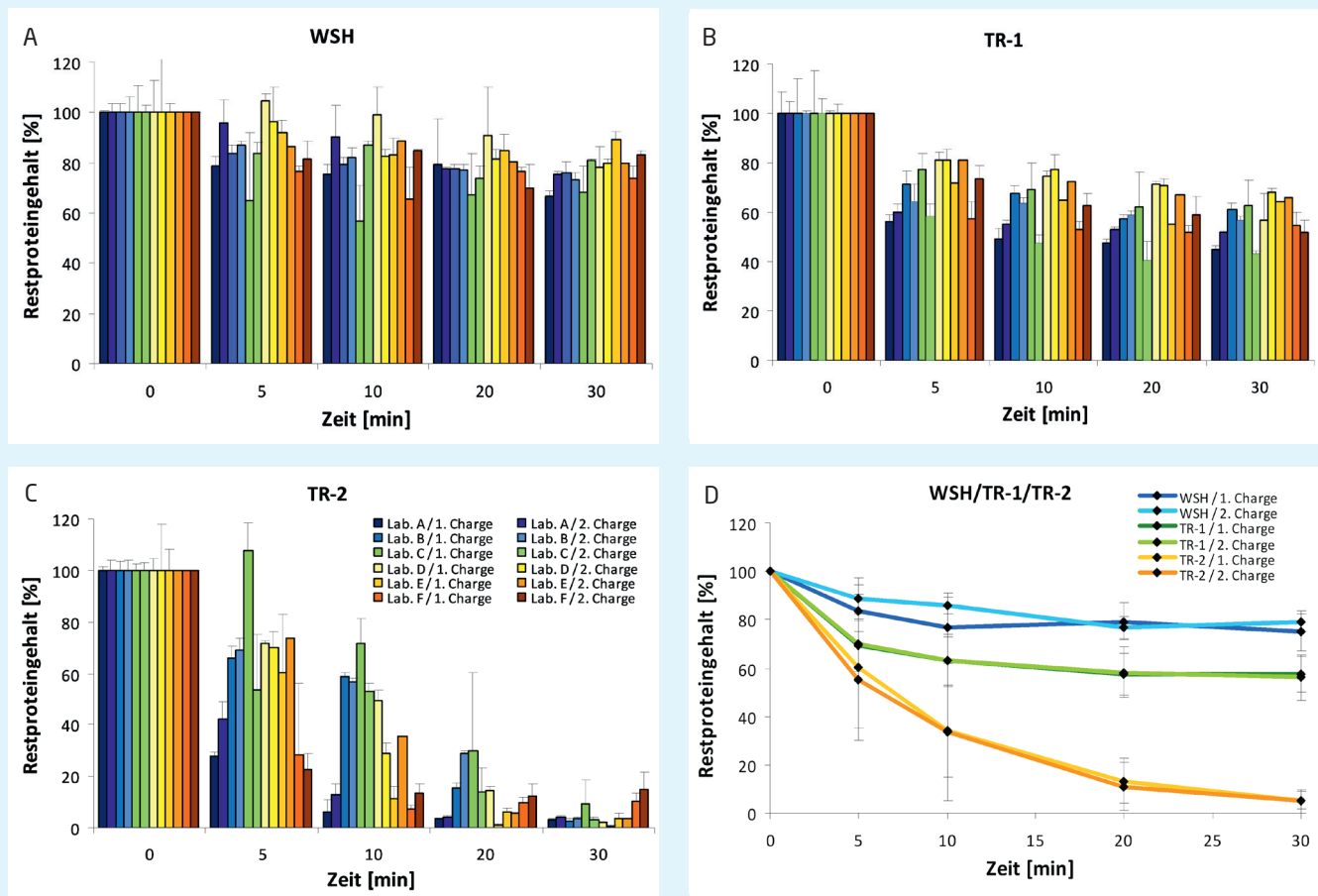


Abb. 10: Reinigungsversuche in WSH und zwei Testreinigern unter der Verwendung von Prüfkörpern mit Fibrinanschmutzung (F-PCD) in sechs Laboren (Lab. A-F). Es wurden zwei Chargen F-PCD hergestellt, die Herstellung von Charge 1 erfolgte mit frischem Schafblut innerhalb von 24 h nach Lieferung, die Charge 2 wurde mit Schafblut hergestellt, das eine Woche im Kühlschrank gelagert worden war. Die Prüfkörper wurden unterschiedlich lange in der Reinigerlösung behandelt (5, 10, 20, 30 min) und der verbliebene Restproteingehalt (Fibrin) nach Elution mittels OPA-Methode bestimmt. Die Labore A - F führten eine Versuchsserie mit je n = 3 F-PCD / Messpunkt für jede Prüfkörper-Charge (1, 2) durch. Der Restproteingehalt ist als prozentualer Wert angegeben und wurde auf die unbehandelten Kontrollen (0 min) bezogen. A: Reinigung in WSH; B: Reinigung in Testreiniger 1 (TR-1); C: Reinigung in Testreiniger 2 (TR-2); D: Die von den Laboren mitgeteilten Restproteingehalte wurden zur Ermittlung des durchschnittlichen Restproteingehalts eingesetzt (Fehlerbalken: Standardabweichung, SD).

lich der Verwendung von aus frischem Blut (Charge 1) oder aus einer Woche gelagertem Blut (Charge 2) hergestellten F-PCD konnten nicht ermittelt werden, lediglich bei der Testung mit WSH waren für den 10 min Messpunkt Unterschiede zu erkennen, die jedoch im Rahmen der Standardabweichung der jeweils anderen Versuchsserie lagen.

3.8 Vergleichende Bewertung der Reinigungsleistung mittels TOC-Methode

Exemplarisch in einem Labor durchgeführte Untersuchungen unter Verwendung der TOC-Methode zur Quantifizierung von Fibrinrückständen ergaben, dass unbehandelte F-PCD der eingesetzten Charge einen Kohlenstoffgehalt von 782 μg (NPOC-Methode) aufwiesen. Bei Reinigungsversuchen unter Einsatz von TR-1 und einer Reinigungszeit von 30 min lag der durchschnittliche Restkohlenstoffgehalt ($n = 3$) bei 446 μg / PCD, bzw. 57,0 %, was in sehr guter Übereinstimmung mit den mittels OPA-Methode ermittelten Restproteingehalten stand (57,4 % bei 1. Charge und 56,2 % bei 2. Charge, Abb. 10).

4. Diskussion

4.1 Prüfanschmutzung Blut

Die Festlegung geeigneter allgemein akzeptierter Prüfanschmutzungen zur Bewertung von Reinigungsprozessen für Medizinprodukte stellt eine bislang ungelöste Herausforderung dar. So werden in DIN ISO/TS 15883-5:2006 [13] 19 verschiedene Prüfanschmutzungen und -verfahren zur Bewertung maschineller Aufbereitungsprozesse genannt. Darüber hinaus sind viele weitere kommerzielle Testsysteme basierend auf anderen bzw. weiteren Prüfanschmutzungen verfügbar, über deren z. T. stark unterschiedliche Entfernbarkeit bei Reinigungsprozessen berichtet wurde [23–25].

Diese Prüfanschmutzungen und Verfahren werden zur Qualifizierung von maschinellen Reinigungsprozessen eingesetzt, bei denen entsprechend des Sinner'schen Modells der Faktor Mechanik vom Reinigungs-Desinfektionsgerät erzeugt wird und damit für das Ergebnis des maschinellen Prozesses eine große Rolle spielt. Daher sind diese Prüfanschmutzungen und Verfahren nicht zur vergleichenden Bewertung, bzw. Qualifizierung des Faktors Chemie, d.h. der alleinigen Wirksamkeit eines Reinigers geeignet [26].

Die DIN *ad hoc*-Gruppe (NAMed 063-04-09) publizierte 2008 [14] und 2009 [15] ihre Ergebnisse zur Entwicklung einer Testmethode zur Bewertung der Reinigungswirkung von Instrumentenreinigern ohne bzw. mit vernachlässigbar geringer Mechanik. Hierbei kam ein Tauchbad-Aufbau zum Einsatz, bei dem durch einen Magnetrührer (350 U / min) eine Strömung zur makroskopischen Unterstützung von Diffusionsprozessen im Tauchbad erzeugt wurde, jedoch keine Mechanik im Sinne des Sinner'schen Modells generiert wurde. In Ringversuchen konnte gezeigt werden, dass eine reproduzierbare und vergleichbare Entfernung des als Prüfanschmutzung eingesetzten reaktivierten verdünnten Schafbluts [14,15] ermittelt werden konnte.

Die Verwendung von reaktiviertem, d.h. koaguliertem, Schafblut als Prüfanschmutzung beruht auf der unmittelbaren Übertragbarkeit der Ergebnisse auf Realinstrumente mit Anschmutzungen aus Humanblut. Blut stellt die dominierende Anschmutzung chirurgischer Instrumente dar. Blut stellt darüber hinaus eine besonders anspruchsvolle Anschmutzung hinsichtlich der Entfernung dar, da Rückstände nach Einwirkung von Hitze ($> 55 - 60 \text{ }^\circ\text{C}$) oder denaturierenden Chemikalien (z.B. Desinfektionswirkstoffen wie Peressigsäure, Aldehyden, QAV mit Aminen [27]) äußerst schwierig zu entfernen sind. Aus diesen Gründen wird reaktiviertes Schaf- oder Pferdeblut sowohl als Surrogat für Anschmutzungen aus Humanblut auf chirurgischen Instrumenten als auch von anderen Medizinprodukten in den jeweiligen Leitlinien als auch in DIN ISO/TS 15883-5, Anhang A, E, I und M genannt.

4.2 Blutbestandteile

Die Prüfanschmutzung Schafblut besteht u.a. aus den korpuskulären (zellulären) Bestandteilen Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten mit einem Hämatokrit gemäß Referenzbereich von 30-38 % (v / v). Die Anzahl der Erythrozyten liegt zwischen $6,5 - 11,3 \times 10^{12} / \text{l}$, diese sind mit Hämoglobin (roter Blutfarbstoff) gefüllt. Der Hämoglobingehalt von Schafblut beträgt nach Referenztablelle [28] 87 - 128 g / l. Bezogen auf jeweils mittlere Proteinkonzentrationen gemäß Referenzbereich, macht Hämoglobin einen Anteil von 70 % des Gesamtproteinge-

halts des Bluts aus und stellt damit die Hauptproteinkomponente des Bluts dar.

Sowohl die Trocknung von Blutanschmutzungen als auch die Inkubation in VE-Wasser kann aufgrund der von normalen physiologischen Bedingungen abweichenden osmotischen Konditionen zu einer Destabilisierung der Erythrozytenmembranen und einem Platzen der Zellen führen. Die Einwirkung zahlreicher Tenside führt ebenfalls zu einer Zerstörung der Membranen. In Folge tritt Hämoglobin aus den Erythrozyten aus. Die Löslichkeit des Hämoglobins in Wasser ist mit 50 % [29] außergewöhnlich hoch und erklärt die sehr schnelle Herauslösung großer Proteinmengen aus Blutanschmutzungen durch wässrige Medien [14, 15, 23, 24, 25, 30, 31]. Dieser Effekt wurde von allen Ringversuch-Teilnehmern beobachtet. Unabhängig davon, ob ein alkalischer oder ein enzymatischer Reiniger oder lediglich WSH eingesetzt wurde, ergaben sich immer nahezu identische Reinigungskinetiken. Blutanschmutzungen bzw. B-PCD erwiesen sich daher als ungeeignet, um zwischen der Reinigungswirkung von Wasser und Reinigern zu differenzieren.

4.3 Fibrin

Neben den korpuskulären Anteilen sind im Blutplasma weitere Proteine (Albumine, Globuline, Fibrinogen, Gerinnungsfaktoren), Ionen und Transportstoffe (Aminosäuren, Kohlenhydrate, Fette, etc.) enthalten. Der Gesamtproteingehalt des Schafbluts setzt sich zusammen aus dem Hämoglobinanteil (87 – 128 g / l Blut), dem Proteinanteil des Blutserums (55 – 75 g / l Serum) und dem Fibrinogenanteil (1,8 – 7,2 g / l Plasma) [32], sodass sich für Schafblut ein Gesamtproteingehalt von 122 – 186 g / l ergibt. Der Fibrinogengehalt beträgt 1,1 – 5,0 g / l Schafblut. Für Humanblut gelten vergleichbare Werte von 1,0 – 2,6 g / l Blut.

Fibrinogen (humaner Gerinnungsfaktor I) ist ein Proteinkomplex, der aus drei unterschiedlichen Fibrinogenuntereinheiten (α , β , γ) aufgebaut ist. Das vollständige humane Heterohexamere besteht aus ca. 3410 Aminosäuren und weist eine Masse von 340 kDa auf [33]. Im nativen Proteinkomplex sind 2 α -, 2 β - und 2 γ -Untereinheiten so angeordnet, dass die Amino-Enden der einzelnen Untereinheiten im Zentrum des Komplexes liegen und untereinander über einen so-

genannten Disulfidring verbunden sind [33,34,35]. Dieses Zentrum mit den Amino-Enden wird als E-Domäne bezeichnet. Die Carboxyenden der Proteine sind nach außen gerichtet und bilden die sogenannte D-Domäne. Das Heterohexamere verfügt über 29 Disulfidbrücken, über drei hochaffine sowie zehn niederaffine Bindestellen für Ca^{2+} [35].

Die makroskopisch als Koagulation des Blutes erkennbare Spaltung des Fibrinogens in Fibrin und die kovalente Kopplung unendlich vieler Fibrineinheiten wird durch eine komplexe Kaskade von Reaktionen ausgelöst, an denen die Gerinnungsfaktoren II bis XIV beteiligt sind [36]. Zusammengefasst kommt es zur Abspaltung von vier kleinen Peptiden (je zwei Fibrinopeptide A und B) aus der E-Domäne und es werden vier neue Amino-Enden exponiert, über die intermolekulare Isopeptidbindungen zu anderen Fibrinmolekülen ausgebildet werden [35] werden. Dies führt zur Bildung des quervernetzten hochmolekularen Fibrins, das als gelartiges Koagel vorliegt und die korpuskulären Blutbestandteile (z.B. Erythrozyten) umschließt. Hieraus ergibt sich die physiologische Funktion als Wundverschluss verletzter Gefäße.

Durch die kovalente Bindung der Fibrineinheiten entsteht ein Makromolekül extrem hohen Molekulargewichts, das unter physiologischen Konditionen in Wasser nicht löslich ist und hohe Anforderungen an Reinigungsprozesse stellt [30,31]. Darüber hinaus zeigten mittels $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Markierung durchgeführte systematische Studien an gereinigten Instrumenten und Prüfkörpern, dass hochmolekulare Fibrinrückstände nicht durch etablierte Elutionsverfahren vollständig solubilisierbar und gegenwärtig nicht mittels etablierter Methoden umfassend quantifizierbar sind [31,37].

4.4 Fibrinprüfkörper

Bei der Herstellung der F-PCD werden durch den Schritt der De-Hämoglobinisierung alle wasserlöslichen Komponenten (Hämoglobin, Albumine, Globuline, etc.) entfernt, sofern diese nicht an der Oberfläche der Fibrinfibrillen adhären. Zurück bleibt ein Hydrogel aus gequollenem Fibrin, das in VE-Wasser oder WSH über mehr als vier Wochen ohne weitere Veränderung des Proteingehalts stabil ist (Daten nicht gezeigt). Um eine einfache Lagerung der Fibrinprüfkörper ohne Gefahr einer mikrobi-

ellen Kontamination zu ermöglichen, erfolgt nach der De-Hämoglobinisierung ein Trocknungsschritt. Hierbei tritt eine Entquellung („Dehydratisierung“) des Fibrin-Hydrogels ein, die zur Verdichtung (Kompaktierung) der Fibrinschicht und zu einer verstärkten Adhäsion (Daten nicht gezeigt) an der Stahloberfläche führt. Die Entquellung des Fibrin-Hydrogels ist nicht vollständig reversibel, d.h. auch eine mehrtägige Inkubation von getrockneten Fibrinprüfkörpern (F-PCD) in VE-Wasser oder WSH führt nicht mehr zum initialen Quellungsgrad, was mutmaßlich durch die Kollabierung der Mikrostruktur durch das Platzen der eingeschlossenen Erythrozyten und dem Auswaschen der Zellinhaltsstoffe verursacht wird.

4.5 Fibringehalt

Die zur Polymerisation des Fibrins führende Koagulationsreaktion ist ein komplexer Prozess, der durch eine Kaskade verschiedener Faktoren (II bis XIV) ausgelöst wird. Darüber hinaus scheinen zahlreiche andere Faktoren wie z.B. Alter des Bluts, Temperatur und Sauerstoffgehalt eine Rolle zu spielen. Im Rahmen von durch fünf Labore parallel durchgeführten Versuchen zur Herstellung von Fibrinprüfkörpern auf der Basis von Schafblut einer Herstellungsladung konnten in den einzelnen Laboren Prüfkörper mit gut reproduzierbarem Fibringehalt und homogener Fibrinverteilung hergestellt werden. Die Standardabweichung für die jeweiligen Prüfkörperchargen ($n = 6 - 9$) in den Laboren beliefen sich auf durchschnittlich 7,74 %, was als akzeptabel beurteilt wurde. Bei der Herstellung einer zweiten Prüfkörpercharge mit demselben Blut, das eine Woche gelagert worden war, erzielten die meisten Labore vergleichbare Fibringehalte. Aufgrund nicht benennbarer unterschiedlicher Faktoren und Einflüsse bei der Koagulationsreaktion in den jeweiligen Laboren konnten im Vergleich der Labore untereinander jedoch nur Prüfkörperchargen mit variierenden Fibringehalten hergestellt werden. Die durchschnittliche Fibrinmenge lag bei $686 \mu\text{g} / \text{F-PCD}$ ($n = 84$) mit einer Standardabweichung von $156 \mu\text{g} / \text{F-PCD}$, dies entspricht einer prozentualen Standardabweichung von 22,7 %. Auf Basis dieser Ergebnisse wurde definiert, dass für Reinigungsversuche jeweils Prüfkörper einer Herstellungs-

charge eingesetzt werden müssen und eine ausreichende Anzahl unbehandelter Kontrollen mitzuführen ist. Darüber hinaus wurde definiert, dass die Auswertung von Reinigungsexperimenten nicht auf der Basis der quantifizierten Fibrinrückstandsmenge, sondern prozentual, bezogen auf den Ausgangswert der unbehandelten Kontrollen, erfolgte.

4.6 Solubilisierung von Fibrin

Für die quantitative Erfassung des hochmolekularen Fibrins mittels etablierter Proteinquantifizierungsmethoden (OPA-, BCA-Methode) ist es zwingend notwendig, die Rückstände in eine gelöste Form zu überführen. Für die Spaltung von hochmolekularem Fibrin bis hin zu einzelnen Aminosäuren sind aggressive Bedingungen, wie z.B. die 26-stündige Inkubation in 6 M HCl bei 110 °C (Überdruck) [38], notwendig. Versuche der AG RMT-Teilnehmer zeigten, dass eine zumindest partielle Auflösung des Fibrinnetzwerks der F-PCD bei Inkubation in alkalischen Lösungen (z.B. 1 % SDS-Lsg, pH = 11) bei 80 °C und mehr als 2-stündiger Inkubation erfolgen kann. Diese Elutionsmethode erwies sich in Ringversuchen jedoch als nicht hinreichend reproduzierbar, sodass zur Beschleunigung der Elution die Inkubationstemperatur auf 121 °C unter Anwendung von Dampfsterilisationsprozessen erhöht wurde. Da es sich hierbei um geschlossene technische Systeme handelt, wurde die Verdampfung der Wasserphase in den Elutionsansätzen minimiert, eine zu berücksichtigende Volumenänderung trat nicht ein. Die Solubilisierung des Fibrins von F-PCD verlief bei allen durchgeführten Ringversuchen in den einzelnen teilnehmenden Laboren quantitativ und reproduzierbar, visuell wahrnehmbare Fibrinrückstände auf den behandelten Prüfkörpern konnten nach Färbung mit Amidoschwarz nicht detektiert werden.

Die bei der thermischen Elution des hochmolekularen Fibrins zugrunde liegenden chemischen Abläufe sind gegenwärtig nicht vollständig verstanden. Zwar wurde schon vor längerer Zeit beschrieben, dass durch SDS sowie durch die kationischen Tenside CTAB, MTAB, HTAB und CPC bei 37 °C eine Solubilisierung von Fibrinzubereitungen [39] oder bei pH-Werten oberhalb von 9,5 in Kombination mit 8 M Harnstoff und 1 M SDS bei 45 °C eine Solubilisierung von Fibrin [40] erfolgt, die mutmaß-

lich auf der Spaltung der intermolekularen Disulfidbrücken beruht, jedoch fehlen abschließende Erkenntnisse zum Mechanismus. Eigene Untersuchungen der AG RMT zur Charakterisierung des solubilisierten Fibrins mittels denaturierender Protein-Acrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) ergaben, dass die thermische Elution zur Freisetzung eines sehr breiten Größenbereichs von Proteinen führte, ein Maximum wurde zwischen ca. 20 – 70 kDa beobachtet. Distinkte Proteinbanden als Indikation für freigesetzte Fibrinketten (α , β , γ) oder Fibrinopeptid A oder B [41] wurden nicht beobachtet. Die uneinheitliche Größenverteilung könnte auch auf das mögliche Vorliegen weiterer löslicher Proteinbestandteile aus dem Plasma hinweisen, da bereits Untersuchungen von Friedrich *et al.* [37] einen Hinweis auf eine stabile Adsorption von ^{99m}Tc -markierten Humanalbumin-Makroaggregaten an Fibrin beschrieben hatten. Vergleichsuntersuchungen der AG RMT zur Untersuchung des Einflusses einer thermischen Behandlung auf Schafblut sowie bovines Serum Albumin (BSA) erbrachten keine Hinweise, dass es zu einer signifikanten Hydrolyse, d.h. Spaltung vorliegender Proteine und einer relevanten Veränderung der Anzahl von BCA-sensitiven Peptidbindungen oder freien OPA-sensitiven α - und ϵ -Aminosäuren, kommt. Darüber hinaus kann eine Quantifizierung des solubilisierten Fibrins prinzipiell auch mittels TOC-Methode erfolgen. Die quantitative Probenengewinnung für die TOC-Bestimmung ist mit 0,001 N NaOH-Lösung und Dampfsterilisationsverfahren ebenso möglich. Mit der TOC-Bestimmung als NPOC-Methode wurden für die Beurteilung der Reinigungswirkung ebenso valide Ergebnisse mit guter Übereinstimmung zu den mit der OPA-Methode analysierten Reinigungsversuchen erhalten.

4.7 Bewertung von Instrumentenreinigern

Das neu etablierte Prüfmodell auf Basis einer getrockneten und langzeitstabilen Fibrinschicht als Prüfanschmutzung erlaubt die Bewertung der Leistung von Instrumentenreinigern anhand der quantitativen Bestimmung von Fibrinrückständen, die bislang nur qualitativ detektierbar waren. Für die Solubilisierung und Quantifizierung der Fibrinanschmutzung darf keine kovalente Quervernetzung durch chemisch reaktive Inhaltsstoffe in Reinigern auftreten. Produkte mit einer solchen fixierenden Wirkung wären als Reiniger ohnehin ungeeignet.

Die Reinigungsversuche unter Verwendung von WSH als Kontrolle ergaben nach einer Behandlungszeit von 30 min eine geringe Abnahme des Proteingehalts um 23 %. Hierbei wurden vermutlich an das unlösliche Fibrin adhärierte [37,42] andere Proteinkomponenten der Blutanschmutzung entfernt, die während des Prüfkörperherstellungsprozesses (De-Hämoglobinisierung in VE-Wasser) aufgrund der anderen Ionenzusammensetzung und Ionenstärke nicht entfernt werden konnten. Im Vergleich dazu wurde bei Reinigungsexperimenten mit dem alkalischen Testreiniger 1 (TR-1) bei pH = 11,7 nach 30 min eine wesentlich höhere Abnahme des Proteingehalts um 43 % ermittelt. Der enzymatische Testreiniger (TR-2) verursachte eine noch stärkere Reduktion des Proteingehalts um 95 %, s. Tab. 2. Während bei einer Behandlungszeit von 5 min bereits eine erste Differenzierung zwischen WSH und Reinigern (TR-1/TR-2) auf Basis der Reduktion des Fibringehalts möglich war (Abb. 9, 10), konnte erst ab Behandlungszeiten von 10 min oder länger zwischen alkalischem und enzymatischem Reiniger differenziert werden.

Als Beispiel für einen nach KRINKO-/BfArM-Empfehlung empfohlenen alkalischen Reiniger wurde Testreiniger 1 (TR-1) in den Versuchen eingesetzt. Dieser vermochte keine Auflösung und Entfernung der Fibrinanschmutzung herbeizuführen, da Isopeptidbindungen und Disulfidbrücken unter den gegebenen Bedingungen nicht gespalten werden konnten. Enzymatische Reinigerformulierungen, die Proteasen enthalten, können das hochmolekulare Fibrinnetzwerk hydrolysieren, was zur vollständigen Entfernung durch Bildung niedermolekularer und gut wasserlöslicher Peptide führt. Hierfür sind jedoch abhängig von der Reaktionskinetik der enthaltenen Proteasen längere Behandlungszeiten notwendig. Das neue Prüfmodell erlaubt, wie in Ringversuchen demonstriert, nicht nur die Bewertung der Wirksamkeit von neutral bis alkalisch eingestellten Reinigern sondern auch die Bewertung der proteolytischen Aktivität von Enzymreinigern. Die von bis zu sechs teilnehmenden Laboren in mehreren Ringversuchen erzielten Ergebnisse zeigten eine sehr gute Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit der neuen Prüfmethode.

4.8 Zukünftige Arbeiten

Gegenwärtige und zukünftige Arbeiten der AG RMT befassen sich mit der Untersuchung der Reinigungswirksamkeit eines größeren Spektrums unterschiedlicher marktverfügbarer Reiniger, um über die Definition von Akzeptanzkriterien die Eignung von Instrumentenreinigern bewerten zu können. Weitere zukünftige Arbeitsaspekte umfassen entsprechend des Arbeitsauftrags die Untersuchung und Bewertung der Reinigung von desinfizierend wirkenden Reinigern oder reinigenden Desinfektionsmitteln.

Reiniger	Arithm. Mittel [%]	SD [%]	Minimum [%]	Maximum [%]
WSH	22,7	6,2	11,1	33,6
TR-1	43,2	8,0	32,1	56,8
TR-2	94,9	4,2	85,3	99,4

Tab. 2 : Reduktion des prozentualen Proteingehalts nach 30 min Behandlung der F-PCD (basierend auf den Ergebnissen des in Abb. 10 dargestellten Ringversuchs, Anzahl der Labore: 6, Anzahl der Versuchsserien je Labor: 2, Anzahl der F-PCD je Versuchsserie je Messpunkt: n = 3, in Summe n = 36 F-PCD pro Reiniger).

4.9 Implikationen für die Beurteilung von Instrumentenaufbereitungsprozessen

Die Arbeiten der AG RMT führten auch zu einem umfangreich erweiterten Verständnis bezüglich der vollständigen Erfassung von Restproteingehalten auf (Instrumenten-)Oberflächen nach Reinigungsprozessen. Es konnte erstmals eine Methode zur vollständigen Solubilisierung von hochmolekularen wasserunlöslichen Fibrinrückständen sowie zur reproduzierbaren Quantifizierung unter Anwendung der OPA- und BCA-Methode etabliert werden. Fibrinrückstände können bekanntlich [24, 27, 30, 31] als Rückstände bei unzureichenden Aufbereitungsprozessen auf Instrumenten verbleiben. Bislang fehlten die notwendigen Methoden zur Probengewinnung, um eine umfassende Quantifizierung vornehmen zu können, sodass davon ausgegangen werden muss, dass es bei der Beurteilung des Restproteingehalts auf Realinstrumenten zu einer Unterschätzung der tatsächlich vorhandenen Restkontamination kommen kann.

■ Danksagung

Wir danken für technische Unterstützung und die Durchführung experimenteller Arbeiten: Alexander Hammermeister¹, Richard Daniel³, Lea Küssner³, Elena Imenova⁶, Vivian Jenett⁶, Beate Nitsch⁷, Heinrich Mußmann¹³, Sylvia Koch¹⁶, Britta Palm¹⁶, Katharina Rohafza¹⁶.

Wir danken den Firmen Borer Chemie AG, Zuchwil, und Chemische Fabrik Dr. Weigert GmbH & Co. KG, Hamburg, für die Bereitstellung von Testreinigern, der Firma Miele & Cie. KG, Gütersloh für die Anfertigung von Trockengestellen für Prüfkörper und dem Verbund für Angewandte Hygiene (VAH) für die finanzielle Unterstützung bei der Beschaffung von Prüfkörpern, Schablonen und Exsikkatoren und der organisatorischen Durchführung der Ringversuche.

■ Literatur

1. Medizinproduktegesetz, MPG. <https://www.gesetze-im-internet.de/mpg/>
2. Medizinprodukte-Betreiberverordnung, MPBetreibV. <https://www.gesetze-im-internet.de/mpbetreibv/>
3. KRINKO/BfArM: Anforderungen an die Hygiene bei der Aufbereitung von Medizinprodukten – Empfehlung der Kom-

- mission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention (KRINKO) beim Robert Koch-Institut (RKI) und des Bundesinstitutes für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM). Bundesgesundheitsblatt 2012;55: 1244–1310
4. DGKH, DGSV, AKI: Leitlinie von DGKH, DGSV und AKI für die Validierung und Routineüberwachung maschineller Reinigungs- und thermischer Desinfektionsprozesse für Medizinprodukte. 5. Auflage. ZentrSteril 2017;25 (Suppl.):1–64
 5. DGKH, DGSV, AKI, VAH: Leitlinie zur Validierung der manuellen Reinigung und manuellen chemischen Desinfektion von Medizinprodukten. mhp Verlag, Wiesbaden, 2013:1–48
 6. DGKH, DEGEA, DGSV, DGVS, AKI: Leitlinie zur Validierung maschineller Reinigungs-Desinfektionsprozesse zur Aufbereitung thermolabiler Endoskope. ZentrSteril 2011;19 (Suppl.3):1–72
 7. DIN EN ISO 15883-1:2014-10: Reinigungs-Desinfektionsgeräte – Teil 1: Allgemeine Anforderungen, Begriffe und Prüfverfahren. Beuth-Verlag, Berlin
 8. AAMI TIR 30:2011: A compendium of processes, materials, test methods, and acceptance criteria for cleaning reusable medical devices. Association for the Advancement of Medical Instrumentation. Arlington, VA, USA
 9. Michels W.: Diskussion der unterschiedlichen internationalen Akzeptanzkriterien zur Bewertung der Reinigungswirkung. Proceedings 2015 zum 7. Kolloquium Medizinische Instrumente im Rahmen der 47. International Detergency Conference, Düsseldorf, 2015:30–35.
 10. Spencer W.: Reiniger: Eine Einführung. ZentrSteril 2016;24(1):42–43
 11. Richtlinie 93/42/EWG des Rates vom 14. Juni 1993 über Medizinprodukte. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/TXT/?uri=celex%3A31993L0042>
 12. Richtlinie 2007/47/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 5. September 2007 zur Änderung der Richtlinien 90/385/EWG des Rates zur Angleichung der Rechtsvorschriften der Mitgliedstaaten über aktive implantierbare medizinische Geräte und 93/42/EWG des Rates über Medizinprodukte sowie der Richtlinie 98/8/EG über das Inverkehrbringen von Biozid-Produkten. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/TXT/?uri=celex%3A32007L0047>
 13. DIN ISO/TS 15883-5:2006-02: Reinigungs-Desinfektionsgeräte – Teil 5:

- Prüfanschmutzungen und -verfahren zum Nachweis der Reinigungswirkung. Beuth-Verlag, Berlin
14. Köhnlein J., Glasmacher R., Heide V., Kunde D., Mohr M., Otto D., Roth K., Staffeldt J., Tiarks P., Wagenknecht S., Werner H.-P., Michels W.: Ringversuch zur Standardisierung einer praxisrelevanten Prüfanschmutzung zur vergleichenden quantitativen Bewertung der Reinigung in Anlehnung an EN ISO 15883. ZentrSteril 2008;16(6):424–435.
 15. Köhnlein J., Glasmacher R., Heide V., Kunde D., Mohr M., Otto D., Pieper M., Roth K., Staffeldt J., Tiarks P., Wagenknecht S., Werner H.-P., Michels W.: Ringversuch zur Standardisierung einer praxisrelevanten Prüfanschmutzung zur vergleichenden quantitativen Bewertung der Reinigung in Anlehnung an EN ISO 15883 – Versuchsbeschreibung. ZentrSteril 2009;17(6):410–415.
 16. Brill F.H.H., Daniel R., Wodrich M., Gabriel H.: Standardisiertes Verfahren zur Anschmutzung von Prüfkörpern für Reinigungsversuche. ZentrSteril 2014;22(6):408–411.
 17. Rabenau H.F., Schwebke I., Blümel J., Eggers M., Glebe D., Rapp I., Sauerbrei A., Steinmann E., Steinmann J., Willkommen H., Wutzler P.: Leitlinie der Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten (DVV) e.V. und des Robert Koch-Instituts (RKI) zur Prüfung von chemischen Desinfektionsmitteln auf Wirksamkeit gegen Viren in der Humanmedizin. Bundesgesundheitsblatt 2015; 58: 493–504. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg
 18. Wehrl M., Kircheis U.: Methode zur Überprüfung der Reinigungsleistung von Reinigungs-Desinfektionsgeräten für flexible Endoskope. HygMed 2011;36(10):402–406.
 19. Popov N., Schmitt M., Schulzeck S., Matthies N.: Reliable micromethod for determination of the protein content in tissue homogenates. Acta Biol Med Ger. 1975;34: 1441–1446.
 20. Frister H., Meisel H., Schlimme E.: Einsatzmöglichkeiten der modifizierten OPA-Methode in der Proteinanalytik. Ernährungs-Umschau 1990; 37(11): 442–445.
 21. Candiano G., Bruschi M., Musante L., Santucci L., Ghiggeri G.M., Carnemolla B., Orecchia P., Zardi L., Righetti P.G.: Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. Electrophoresis 2004;25(9):1327–1333

22. DIN EN ISO 483:2006-02: Kunststoffe – Kleine Kammern für die Konditionierung und Prüfung bei konstanter relativer Luftfeuchte über wässrigen Lösungen. Beuth-Verlag, Berlin
23. Desbuquois C., Richard M., Khammo N., McDonnel G., Pineau L.: Bewertung künstlicher Prüfanschmutzungen für Studien zur Reinigungswirksamkeit. ZentrSteril 2010;18(1):19–35.
24. Buchrieser N., Buchrieser V., Freundlinger T., Gehrler M., Getreuer H., Gruber A., Haljko M., Hell M., Koller W., Lachner P., Miorini T., Mittermayer H., Palmisano G., Percht A., Prüfert-Freese U., Schröttner J., Steinhart A., Suchoemel M., Weinmayr B.: Prüfmethode(n) (und Prüfanschmutzungen) für Reinigungs-Desinfektionsgeräte für chirurgische Instrumente im praxisnahen Vergleich. ZentrSteril 2009;17(5):327–337.
25. Crutwell M.: A comparison of surgical instrument test soils published in ISO/TS 15883-5. ZentrSteril 2008;16(4):256–265.
26. Rosenberg U.: Qualifizierung von Prozesschemikalien. ZentrSteril 2017; 25(6): 382–388.
27. Kampf G., Bloß R., Martiny H.: Surface fixation of dried blood by glutaraldehyde and peracetic acid. J. Hosp. Infec. 2004;57:139–143.
28. Moritz A. (Hsg.): Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin. 7. Auflage 2013, Schattauer/Thieme-Verlag, Stuttgart, ISBN: 9783794527373
29. Artmann G.M., Kelemen C., Porst D., Büldt G., Chien S.: Temperature transition of Protein properties in human red blood cells. Biophys. J. 1998;75:3179–3183.
30. Michels W., Pieper M.: Eigenschaften von Blut und Einfluss auf die Reinigung. ZentrSteril 2004;12(5):324–330.
31. Pfeifer M.: Standardisierte Testanschmutzung Blut 1: Zusammensetzung, Herstellung, Anwendung. ZentrSteril 1998;6(6):381–385.
32. Baumeister C.: Labordiagnostik in der Tierarztpraxis. Ein Handbuch für Tiermedizinische Fachangestellte. 2. erweiterte Auflage, Lehmanns Media GmbH, 2016, ISBN 13: 9783865418814
33. Doolittle R.F., Spraggon G., Everse S.J.: Three-dimensional structural studies on fragments of fibrinogen and fibrin. Current Opinion in Structural Biology 1998;8:792–798.
34. Hunziker E.B., Straub P.W., Haeberli A.: Molecular morphology of fibrin monomers and early oligomers during fibrin polymerization. Journal of Ultrastructure and Molecular Structure Research 1988;98(1):60–70.
35. Lugovskoi E.V., Gritsenko P. G., Komisarenko S. V.: Molecular Mechanisms of the Polymerization of Fibrin and the Formation of Its Three-Dimensional Network. Russian Journal of Bioorganic Chemistry 2009;35(4):393–410.
36. Berg J.M., Tymoczko J.L., Gatto G.J., Stryer L.: Stryer Biochemie. 8. Auflage 2018, Springer Spektrum Verlag, ISBN 978-3-8274-2989-6
37. Friedrich T., Roth K., Gauer J., Heeg P.: Untersuchungen zur Recovery-Rate von Restkontamination bei der Validierung von Reinigungs-Desinfektionsgeräten nach EN DIN 15883 Teil 1. ZentrSteril 2007;15(2):93–100.
38. Roach D., Gehrke C.W.: The hydrolysis of proteins. Journal of Chromatography A 1970;52:393–404.
39. Chakrabarty S.: Fibrin solubilizing properties of certain anionic and cationic detergents. Thrombosis research 1989;55(4): 511–519.
40. Loewy A.G., Gallant J.A., Dunathan K.: Fibrinase – IV. Effect on fibrin solubility. Journal of Biological Chemistry 1961;236(10):2648–2655.
41. Gaffney P.J.: Molecular aspects of fibrin clot solubilization. Nature New Biology 1971;234(29): 281–282.
42. Morton T.J., Fürst W., van Griensven M., Redl H.: Controlled release of substances bound to fibrin-anchors or of DNA. Drug Delivery 2009;16(2):102–107.