

**Schlüsselwörter**

- Reinigung
- EN ISO 15883
- Prüfanschmutzung
- Standardisierung

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

J. Köhnlein<sup>1</sup>, R. Glasmacher<sup>2</sup>, V. Heide<sup>2</sup>, D. Kunde<sup>3</sup>, M. Mohr<sup>3</sup>, D. Otto<sup>4</sup>, M. Pieper<sup>6</sup>,  
K. Roth<sup>5</sup>, J. Staffeldt<sup>4</sup>, P. Tiarks<sup>4</sup>, S. Wagenknecht<sup>5</sup>, H.-P. Werner<sup>1</sup>, W. Michels\*

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

## Einleitung:

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

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

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

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

## Material und Methodik

### Versuchsaufbau

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

### Prüfkörper

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

### Prüfanschmutzungen und Anschmutzung der Prüfkörper

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

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

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

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

### Trocknung bzw. Konditionierung

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

### Versuchsdurchführung

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

### Elution des Restproteins vom Prüfkörper

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

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

### Proteinanalytik

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

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

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

### Ausblick

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

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

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

### Literatur

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

**Keywords**

- cleaning
- EN ISO 15883
- test soil
- standardisation

# 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

*J. Köhnlein<sup>1</sup>, R. Glasmacher<sup>2</sup>, V. Heide<sup>2</sup>, D. Kunde<sup>3</sup>, M. Mohr<sup>3</sup>, D. Otto<sup>4</sup>, M. Pieper<sup>6</sup>, K. Roth<sup>5</sup>, J. Staffeldt<sup>4</sup>, P. Tiarks<sup>4</sup>, S. Wagenknecht<sup>5</sup>, H.-P. Werner<sup>1</sup>, W. Michels\**

**The ad hoc group "Test soils and methods", part of the standards committee NA Med 063-04-09 of the DIN, had reported in a previous edition of this journal initial results of a multicentre trial with an "in vitro reference system" for the comparative evaluation of test soils for testing the cleaning performance of washer-disinfector appliances (WD) according to EN ISO 15883-1 and ISO/TS 15883-5. Exploratory information about materials and methods was given there. This contribution now gives detailed information on the execution of the tests.**

### Introduction

The test soils for proving cleaning performance of washer-disinfector appliances (WD), published since 2005 in the "Technical specification ISO/TS 15883-5" (1), are not all particularly relevant to the practical situation, when subjectively evaluated. Ultimately the relevance must be substantiated using quantitative tests, so that tests, for example in the frame of a Type Test, yield information with a sufficiently high probability that the WD and its processes are capable of fulfilling successfully relevant tasks in the practical situation.

The test soils for surgical instruments should simulate native human blood, as this is the chief actual soil in practice. The point of testing cleaning performance in the frame of the Type Test is to see if the WD and its processes fulfil what are known as the basic requirements. The characteristics that considerably influence cleaning results are for example coagulation, polymerisation (fibrin), denaturation/fixing (temperature/chemistry), foam

formation (cleaning pressure) etc., which are reflected in the characteristic removal of soils under various conditions. Kinetic examination of the detachment behaviour of test soils compared to actual soils can yield information about the practical relevance, or about the quality of simulation of the practical situation.

The establishment of detachment kinetics under various conditions relevant to automatic cleaning processes has already been reported on (2). This is possible with the test execution described in detail below.

### Materials and methods

#### Experimental set-up

The test apparatus used to establish detachment kinetics can be put together from appliances normally found in laboratories. A spray test rig is difficult to standardise and removal of soil in an immersion bath simulates the unfavourable case of dirty instrument surfaces to be cleaned in a WD, that are not directly impacted by jets of cleaning fluid and which the cleaning solution really only runs over. To simulate this in a laboratory test a moderate but uniform exchange of liquid is necessary!

The uniform geometries and the movement of liquid in the small immersion bath are of crucial significance. For this a 100 ml glass beaker, low form (VWR, Darmstadt, Order No. 213-1122) was chosen. To agitate the liquid, magnetic stirrers (Heidolph, Schwabach or IKA, Staufen) were used with the fine adjustment at 350 rpm (+/- 20) as well as magnetic stirrer rods

25 mm in length and 6 mm in diameter (VWR, Darmstadt, Order No. 442-4524). First of all a larger container was placed on the magnetic stirrer, and in this was placed the glass beaker containing 100 ml of the solution to be tested and a magnetic stirrer rod was added. The container was filled with water up to the 80 ml mark on the glass beaker and recirculated using a circulation thermostat so that the predetermined test temperature was kept to within an accuracy of +/-1 °C. This was monitored by calibrated temperature sensors in the glass beaker as well as in the water bath. The test objects were exposed to the solution by being held in the centre of the glass beaker by a Crile clamp fixed to a tripod clamp.

#### Test objects

In order to test two different surfaces, test objects made of matt glass (15×60×1 mm, Menzel-Gläser, Braunschweig, Germany) and stainless steel (15×50×1 mm, Pereg, Waldkraiburg, Germany) were chosen. The

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

1 Hyg Cen GmbH, Bornhövedstr. 78, 19055 Schwerin, Germany

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

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

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

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

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

test objects were thoroughly cleaned before use. This entailed removing coarse dirt with a sponge under running water, then boiling in 5% Decon90 solution (VWR, Darmstadt, Order No. 148-0324) for 10 minutes, then pouring off the solution. The test objects were then held with forceps and rinsed for 5 seconds under running fully demineralised water and then briefly dipped in 70% ethanol. Drying followed on filter paper exposed to ambient air.

#### Test soils and soiling of test objects

For the test soils we chose at first to use heparinised sheep's blood (Order No. 31400500) and citrated sheep's blood (Order No. 31200100), both from Fiebig Nährstofftechnik, Idstein-Niederauhoff. (Note: the blood should be as fresh as possible and not older than one week. The blood is kept at 4 °C in the fridge and before use a test portion is removed and warmed to room temperature.)

1 ml of HPLC water (Merck Chemicals, Darmstadt, Order No. 1153332500) was added to 9 ml of heparinised blood, mixed thoroughly and coagulation was reactivated by addition of 150 µl protamine hydrochloride (50 mg in 5 ml = 1000 I.E./ml, ICN Pharmaceuticals, Frankfurt). For 10 ml citrated sheep's blood reactivation was effected by adding 300 µl of a 250 mmol CaCl<sub>2</sub> solution.

The test objects were soiled using 100 µl blood evenly spread with a pipette on a surface of 1 × 2 cm on the lower end of the test object. For the later measurement of the initial amount as protein, two test objects were also put into screw tubes pre-filled with 1% sodium dodecyl sulphate (SDS, always adjusted to pH 11 using a 0.1 molar sodium hydroxide solution) and glass microspheres (details under "Elution of residual protein") were added. Additionally the protein content of the blood was determined by pipetting two 100 µl blood samples into screw tubes each pre-filled with 5 ml 1% SDS.

#### Drying/Conditioning

It was found that drying for 1.5 h in an incubator at 30 °C yielded very differing results from the various laboratories involved, so conditioning followed under strictly defined conditions. 140 g potassium carbonate was boiled in 100 ml fully demineralised water and then allowed to

cool. This saturated solution was transferred to a large Petri dish and placed on the bottom of the dessicator. A humidity sensor was fixed in the dessicator (e.g. Almemo, Holzkirchen), which was then closed and placed in an incubator at 30 °C. After a few hours a relative humidity of 45% was reached. After the first coagulation in ambient air the test objects were placed (15 minutes after soiling) in the dessicator in open Petri dishes and conditioned thus for 24 (+/- 2) hours. After this the test objects were transferred to Petri dishes, sealed air tightly (e.g. Parafilm) and made available for the execution of the experiments.

#### Test procedure

Beakers of 100 ml HPLC water or the solution to be tested (with or without detergent) were pre-warmed in a water bath. For each individual experiment with a determined exposition time to establish the kinetics (60 or 30 sec. intervals), one beaker was fitted with a magnetic stirrer rod, placed in the warming bath on the magnetic stirrer, stirred at 350 rpm and the exact temperature e.g. 45 °C +/- 1 °C was awaited. When the desired temperature was reached, during all of our test series a 5 ml sample was taken from the water or solution in the beaker for a blank value checkup. Then the test object was fixed centrally in the glass beaker using a Crile clamp on a tripod and simultaneously the stopwatch was started. Test objects were removed immediately after the exposition time was up. As a control of the method a portion of the solution was extracted from the glass beaker. At the end, residual protein on the test object, the blank value checkup, as well as the protein content of the liquid in the glass beaker was quantitatively analysed. Sampling from the test objects was carried out by elution.

#### Elution of residual protein from the test objects

The test objects were each transferred to screw tubes (15 ml, Sarstedt, Nümbrecht, Order No. 60/732.001). Glass microspheres (200 – 420 µm, Potters Europe, Kirchheimbolanden, cleaned in the same way as the test objects) had already been added to these up to the 1 cm mark, as well as 5 ml of a 1% sodium dodecyl

sulphate (SDS) solution adjusted to pH 11. The screw tubes were then intensively shaken on a horizontal laboratory shaker (e.g. IKA MS2 from IKA, Staufen) for 20 mins. at 300 rpm. Finally the test objects were again removed with forceps and a portion of the eluate was transferred for protein determination. The test objects and glass microspheres were later subjected to thorough cleaning as described under "Test objects".

#### Protein analysis

The modified OPA method was used to determine the blood protein content, the initial contamination of the test objects, the blank value of the solution, the residual protein on the test objects after exposition and the dissolved protein in the liquid in the glass beaker. As the thiol component either N,N-dimethyl-2-mercapto-ethylammonium chloride or 2-mercaptoethane sulfonic acid were used, which both lead to the stable, fluorescent 1-alkylthio-2-alkylisindoles whose absorption maximum can be detected at 340nm (3,4).

Each time fresh OPA solution was prepared with one of the thiol components. Here 80 mg o-phthalaldehyde was dissolved in 2 ml methanol and added to 50ml 0.1 mol/l (2.0122 g/50 ml) disodium tetraborate buffer (pH 9.3). Then 200 mg N,N-dimethyl-2-mercapto-ethylammonium chloride or 234 mg 2-mercaptoethane sulfonic acid as a sodium salt was added and finally 2.5 ml aqueous 20% sodium dodecyl sulphate solution (Chemicals: Merck, Darmstadt; Serva, Heidelberg). The same relative amounts of sample solution to OPA solution were always maintained: e.g. 400µl sample to 2 ml OPA solution were placed in a quartz cuvette, or suitable disposable cuvette, stirred thoroughly and then the extinction read off after 3 minutes against pure OPA solution using a photometer (e.g. Varian, Darmstadt, Cary 100) at 340 nm. The volume relationship between sample and OPA solution may not exceed 1:1. From time to time it is necessary to check the pH value, as it may deviate from pH 9.3 for larger sample proportions. It is advantageous to use a double-beam photometer so that zero calibration takes place automatically against pure OPA solution. Measurement of intrinsic extinction was conducted using the same proportional amounts of sample so-

lution to a solution made up from 2.0122 g disodium tetraborate (pH 9.3), 2 ml methanol und 2.5 ml 20% SDS solution in 50 ml HPLC water, against the same solution without added sample. To calculate the amount of protein as an equivalent of bovine serum albumin, it makes sense to have carried out a dilution series (calibration line) to determine a reference point for samples, using pure bovine serum albumin (Fraktion V, Serva, Heidelberg) using the same mixing proportions

### Future prospects

In the meantime multicentre tests using the ad hoc group's methods described here have been conducted by another group of laboratories, in order to work out a guideline for the validation of processes in washer-disinfectors for flexible en-

dosscopes. The results showed good conformity (5). This shows that the method presented is suitable and easy for other laboratories to conduct without great investment of finances or time.

The ad hoc group is now working on establishing detachment kinetics with the test soils described in ISO/TS 15883-5 as well as native human blood, thus allowing comparative assessment. ❄

### References

1. Reinigungs-Desinfektionsgeräte – Teil 5: Prüfanschmutzungen und -verfahren zum Nachweis der Reinigungswirkung (ISO/TS 15883-5:2005)
2. Köhnlein J, Glasmacher R, Heide V, Kunde D, Mohr M, Otto D, Roth K., Staffeldt J., Tiarks, P., Wagenknecht S., Michels W: Ringversuch zur Standardisierung einer praxisrelevanten Prüfanschmutzung zur vergleichenden quantitativen Bewertung der Reinigung in Anlehnung an EN ISO 15883. Zentr Steril 2008 16 (6):424–435.
3. Frister H, Michels W: Vergleichende Bewertung und Optimierung der Reinigungsleistung maschineller Dekontaminationsverfahren. HygMed 1994; 12: 673–688.
4. Michels W, Frister H: The modified OPA method with an alternative thiol component. Zentr Steril 2004; 12: 117–118.
5. Persönliche Mitteilung der Leitliniengruppe mit Vertretern der Gesellschaften DEGEA (Deutsche Gesellschaft für Endoskopieassistentenpersonal), DGKH (Deutsche Gesellschaft für Krankenhaushygiene), DGSV (Deutsche Gesellschaft für Sterilgutversorgung), AKI (Arbeitskreis Instrumentenaufbereitung). [*Personal memoranda of the guideline group with representatives of the DEGEA (German Society for Endoscopy assistants), (DGKH German Society for Hospital Hygiene), DGSV (German Society for Sterilisation services and the) AKI (Working group Instrument Reprocessing).*]