



Deutsche Gesellschaft für
Krankenhaushygiene /
German Society of Hospital Hygiene

Verantwortlich:
Prof. Dr. med. Martin Exner
(Präsident)
Prof. Dr. med. Walter Popp
(Vizepräsident)

Bleibtreustr. 12 a
10623 Berlin, Germany
Tel: +49 30 8855 1615
Fax: +49 30 8851 029
E-Mail: info@krankenhaushygiene.de
Internet:
www.krankenhaushygiene.de.

Korrespondierende Autoren

Dr. rer. nat. Markus Wehrl

wfk - Cleaning Technology Institute e.V.
Campus Fichtenhain 11
47807 Krefeld
E-Mail: m.wehrl@wfk.de

Dr. rer. nat. Ulrike Kircheis

Charité – Universitätsmedizin Berlin
Technische Hygiene
Hindenburgdamm 27
12203 Berlin
E-Mail: ulrike.kircheis@charite.de

Markus Wehrl¹, Ulrike Kircheis²

¹ wfk – Forschungsinstitut für Reinigungstechnologie e.V., Krefeld, Deutschland
² Charité – Universitätsmedizin Berlin, Technische Hygiene, Berlin, Deutschland

Methode zur Überprüfung der Reinigungsleistung von Reinigungs-Desinfektions- geräten für flexible Endoskope

Die im Folgenden beschriebene Methode wird als Anhang in der in Vorbereitung befindlichen „Leitlinie von DGKH, DGSV, DGVS, DEGEA und AKI für die Validierung maschineller Reinigungs- und Desinfektionsprozesse zur Aufbereitung thermolabiler Endoskope“ enthalten sein.

Das in der Norm DIN ISO/TS 15883-5 Anhang I beschriebene Verfahren mit einer Prüfanschmutzung aus reaktiviertem Schafblut und *Enterococcus faecium* als Prüforganismus [1] wird hinsichtlich einer Reinigungsprüfung durch einen quantitativen Proteinnachweis mit der modifizierten OPA-Methode ergänzt [2]. Bei Verwendung von reaktiviertem Schafblut als Prüfanschmutzung stellt die Bestimmung des Proteingehalts einen geeigneten Leitparameter zur Überprüfung der Reinigungsleistung dar.

Zur Erarbeitung eines detaillierten Methodenprotokolls und dessen Überprüfung in Ringversuchen wurde von der Leitliniengruppe die Bildung einer Methodengruppe initiiert.

Die Koordinatoren aus dieser Leitliniengruppe waren: Priv. Doz. Dr. Holger Biering für den Arbeitskreis Instrumentenaufbereitung (AKI), Dr. Birgit Kampf als Vertreterin der Endoskophersteller und Prof. Dr. Heike Martiny für die Deutsche Gesellschaft für Krankenhaushygiene e. V. (DGKH). Die Methodengruppe wurde unterstützt von Frau Verona Schmidt, Koordinatorin der Leitliniengruppe RDG-E für den AKI.

Die Mitglieder der Methodengruppe waren folgende Institutionen und Firmen: Biotech GmbH, vertreten durch Dr. Olaf Kaup; Charité – Universitätsmedizin Berlin, vertreten durch Dr. Ulrike Kircheis; HS System- und Prozesstechnik GmbH, vertreten durch Ingo Hannemann; Hybeta GmbH, vertreten

durch Christiaan Meijer und Christoph Keller; HygCen Centrum für Hygiene und medizinische Produktsicherheit GmbH, vertreten durch Johanna Köhnlein und Monika Feltgen; Simicon GmbH, vertreten durch Paul Gerhard Simon und Cilli Sedlacek; SMP GmbH, vertreten durch Klaus Roth und Dr. habil. Ludger Schnieder; Verbund für Angewandte Hygiene e. V. (VAH) und Universität Bonn, vertreten durch Dr. Jürgen Gebel; wfk - Cleaning Technology Institute e. V., vertreten durch Dr. Markus Wehrl.

Die Ergebnisse der Ringversuche werden zu einem späteren Zeitpunkt publiziert.

1 Einleitung

Die Reinigungsleistung eines Reinigungs-Desinfektionsgeräts für flexible Endoskope (RDG-E) muss sowohl im Rahmen von Typprüfungen als auch bei der Leistungsqualifikation im Rahmen der Validierung überprüft werden.

Bisher kann hierzu das Verfahren nach DIN ISO/TS 15883-5 Anhang I mit einer Prüfanschmutzung aus reaktiviertem Schafblut und *Enterococcus faecium* als Prüforganismus verwendet werden. Die Bestimmung der Reinigungsleistung erfolgt über die abnehmende Anzahl überlebender Prüforganismen.

In dem von der Methodengruppe etablierten Verfahren zur Bestimmung der Reinigungsleistung anhand des Leitparameters Proteingehalt wird als Prüfkörper ein PTFE (Polytetrafluorethylen)-Schlauch mit einer Länge von 200 cm und einem Innendurchmesser von 2 mm verwendet (Schlauchmodell nach DIN ISO/TS 15883-5 Anhang I). Dieser wird im Schlauchinneren mit einer Prüfanschmutzung aus reaktiviertem Schafblut versehen. Für die Beurteilung der Rei-

nigungsleistung wird zum einen der Restproteingehalt in behandelten Prüfkörpern ermittelt. Optional kann zum anderen der Reduktionsfaktor (RF) der Proteinmenge berechnet werden.

Für die Quantifizierung des Proteingehalts wird die modifizierte ortho-Phthaldialdehyd (OPA)-Methode verwendet. OPA bildet in Gegenwart von N,N-Dimethyl-2-mercaptoethylammoniumchlorid mit α - und ϵ -Aminogruppen der Proteine ein stabiles, fluoreszierendes Alkylthio-2-alkylisoindol. Dieses wird photometrisch bei 340 nm quantifiziert. Da die OPA-Methode nur freie primäre Aminogruppen der Proteine detektiert, wird die Methode auf das etablierte Modellprotein Bovines Serum Albumin (BSA, Fraktion V) kalibriert.

In der hier dargestellten Methode wird die Anfertigung von Prüfkörpern, die Elution von Anschmutzungsrückständen und die Quantifizierung von Proteinen in den Rückständen mittels OPA-Methode behandelt.

2 Material

2.1 Prüfkörper

2.1.1 Prüfanschmutzung

- Schaftblut heparinisiert mit 10 IE Heparin ml^{-1} . Es sollte bevorzugt „gepooltes“ Blut, d. h. eine Mischung aus dem Blut mehrerer Tiere verwendet werden. Die Qualität des Blutes entspricht dann den Anforderungen, wenn die Protein-Wiederfindungsraten für unbehandelte Prüfkörper (Positiv-Kontrollen) bei über 70 % und deutlich unter 100 % liegen. Schaftblut kann von kommerziellen Anbietern bezogen werden (z. B. Acila GmbH, Fiebig Nährstofftechnik)
- Protaminhydrochlorid oder Protaminsulfat, zugegebene Menge 15 IE ml^{-1} Blut (z. B. Protamin Valeant 1000 I.E. ml^{-1} von Fa. Valeant Pharmaceuticals Germany GmbH)
- 0,9 %-ige physiologische Kochsalzlösung (NaCl-Lsg.)

2.1.2 Prüfkörpermaterial

- PTFE-Schläuche, 200 cm Länge, 2 mm Innendurchmesser, 0,5 mm Wandstärke (z. B. Fa. VWR International GmbH, Best.-Nr.: 228-4134). Eine Vorbehandlung der PTFE-Schläuche mit Reiniger hat sich als nicht notwendig herausgestellt
- Silikonschlauchstücke ca. 2 cm lang, Innendurchmesser 2 mm (z. B. Fa. Carl Roth, Best.-Nr.: 9559.1) oder alternativ:

Silikonschlauch 1 cm lang, Innendurchmesser 2 mm und Silikonschlauch 2 cm lang, Innendurchmesser 4 mm

- Ggf. rote Verschlussknoten (z. B. Fa. Angiokard, Best.-Nr.: AK 64900)

2.1.3 Geräte, Verbrauchsmaterial

- Waage mit einer Auflösung von ≤ 1 mg, kalibriert
- Diverse einstellbare Mikroliterpipetten, kalibriert
- 10 ml Einmalspritzen
- 20 ml Einmalspritzen
- Pipettenspitzen, divers

2.2 OPA-Methode

2.2.1 Geräte und Verbrauchsmaterial

- UV/VIS-Photometer mit Eignung für $\lambda = 340$ nm
- Küvetten: Quarz oder Einmalküvetten* (s. unten) mit Eignung für $\lambda = 340$ nm
- pH-Meter, kalibriert
- Waage mit einer Auflösung von ≤ 1 mg, kalibriert
- Messkolben 100 ml, Klasse A (z. B. Fa. Carl Roth, Best.-Nr.: Y281.1)
- Vollpipetten 5 ml, Klasse A oder AS (z. B. Fa. Carl Roth, Best.-Nr.: E976.1)
- Vollpipetten 2 ml, Klasse A oder AS (z. B. Fa. Carl Roth, Best.-Nr.: E973.1)
- Diverse einstellbare Mikroliterpipetten, kalibriert
- Pipettenspitzen, divers
- Reaktionsgefäße, divers
- Schraubröhrchen, divers

** Bei der Verwendung von Einmalküvetten sollte die Konstanz der optischen Eigenschaften überprüft werden. Dazu werden mindestens 8 Küvetten mit 1 % SDS-Lösung gefüllt und am Photometer bei $\lambda = 340$ nm vermessen. Der Unterschied zwischen den einzelnen ermittelten Extinktionswerten sollte $\leq \pm 0,005$ betragen. Die Verwendung von Einmalküvetten wird präferiert, da keine Fehler durch unzureichende Reinigung auftreten können.*

2.2.2 Chemikalien

- ortho-Phthaldialdehyd, p.a.-Qualität (z. B. Fa. Merck, Best.-Nr.: 1.11452.0005)
- Methanol, p.a.-Qualität (z. B. Fa. Merck, Best.-Nr.: 1.06009.1011)
- Dinatriumtetraborat, wasserfrei, p.a.-Qualität (z. B. Fa. Merck, Best.-Nr.: 1.06306.0250)
- 1 % SDS-Lösung (w/w) in H_2O , eingestellt mit NaOH auf pH = 11 (SDS, Natri-

umdodecylsulfat, Qualität für biochemische Zwecke (z. B. Fa. Merck, Best.-Nr.: 1.12533.0050))

- 20 % SDS-Lösung (w/w) in H_2O , pH-Wert nicht eingestellt
- 2-(Dimethylamino)ethanethiolhydrochlorid, 95 % (z. B. Fa. Aldrich, Best.-Nr.: D14 1003-25G)
- L-Leucin, Qualität für biochemische Zwecke (z. B. Fa. Merck, Best.-Nr.: 1.05360.0025)
- Bovines Serum Albumin (BSA), Fraktion V, Reinheit ≥ 98 % (z. B. Fa. Carl Roth, Best.-Nr.: T844.2)
- Kommerzieller BSA-Standard, Fraktion V, mit spezifizierter Konzentration zwischen 100 – 200 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (z. B. Fa. Thermo Scientific, Prod.-Nr.: 23208: ready-to-use Standardreihe mit $7 \times 3,5$ ml, mit den Konzentrationen 125, 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000 $\mu\text{g ml}^{-1}$)
- 0,1 M NaOH-Lsg. in H_2O
- H_2O , HPLC-Qualität (z. B. Fa. Merck, Best.-Nr.: 1.15333.2500)

2.2.3 Lösungen

2.2.3.1 OPA-Reagenz

Die zum Ansetzen des 2-fach konzentrierten OPA-Reagenz verwendeten Chemikalien und die entsprechenden Mengen werden beispielhaft für einen Ansatz mit 50 ml Volumen in Tabelle 1 angegeben. Zunächst wird das Dinatriumtetraborat in der entsprechenden Menge H_2O (HPLC-Qualität) unter Erwärmung auf 40°C gelöst. o-Phthaldialdehyd und 2-(Dimethylamino)ethanethiolhydrochlorid werden in der entsprechenden Menge Methanol gelöst. Diese Lösung wird zur Dinatriumtetraborat-Lösung hinzugefügt und abschließend die entsprechende Menge 20 % SDS-Lsg. hinzupipettiert. Das OPA-Reagenz ist täglich frisch anzusetzen.

2.2.3.2 Reagenz zur Bestimmung der Protein-Eigenextinktion

Zur Bestimmung der Eigenextinktion von Proteinproben wird folgendes Reagenz verwendet. Die Ansatzmengen für das 2-fach konzentrierte Reagenz sind in Tabelle 2 beispielhaft für einen 50 ml Ansatz zusammengefasst.

2.2.3.3 BSA-Standards

Zur Kalibration der OPA-Methode werden Standards mit definierten Konzentrationen des Modellproteins Bovines Serum Albumin (BSA), Fraktion V, verwendet. Zum Ansetzen der Standards wird zunächst eine Stammlösung mit 100 mg BSA ad 100 ml 1 % SDS-

Lsg. im Messkolben angesetzt. Die Verdünnung der Stammlösung wird mittels 5 ml Vollpipetten vorgenommen. Dazu werden sowohl 5 ml der jeweiligen BSA-Lösung als auch 5 ml der 1 % SDS-Lsg. in ein sauberes Gefäß pipettiert. Durch Wägung des Gefäßes vor, bzw. nach jeder Volumenzugabe kann die Genauigkeit der Verdünnung überprüft werden. Alternativ kann eine volumetrische Überprüfung durch Verwendung eines 10 ml Messkolbens erfolgen. Der Fehler sollte $\pm 0,3\%$ (Pipetten 5 ml, Klasse A/AS) betragen. Es werden folgende BSA-Standards entsprechend dem Verdünnungsschema in Tabelle 3 angelegt.

2.2.3.4 Leucin-Standard

Zur Herstellung werden 2 ml einer 0,01 M L-Leucin-Lösung in H₂O mit einer Vollpipette abgemessen, in einen 100 ml Messkolben überführt und mit Wasser ad 100 ml aufgefüllt. Die Überprüfung der Verdünnung erfolgt gravimetrisch.

3 Methoden

3.1 Prüfkörper

3.1.1 Herstellung der Prüfanschmutzung

Das heparinisierte Schafblut, die Protaminlösung und die physiologische Kochsalzlösung werden auf Raumtemperatur gebracht und gut gemischt. Für die Anschmutzung von einem Prüfkörper werden folgende Mengen verwendet:

- 11,4 ml heparinisiertes Schafsblut
- 0,42 ml 0,9 %-ige NaCl-Lösung
- 0,18 ml Protaminlösung mit 180 IE

Alle Lösungen werden nacheinander in ein Becherglas pipettiert und gründlich, jedoch vorsichtig gemischt, um Blasenbildung und Scherkräfte zu vermeiden. Um die Gerinnungszeit des Schafbluts zu bestimmen, wird unmittelbar nach Zugabe des Protamins eine Stoppuhr gestartet. Nach der Durchmischung wird ein Aliquot von 100 µl der Prüfanschmutzung entnommen und in 9,9 ml 1 % SDS-Lösung verdünnt, um nachfolgend den Proteingehalt der Prüfanschmutzung mittels OPA-Methode zu bestimmen.

3.1.2 Anschmutzung der PTFE-Schläuche

Die 200 cm langen PTFE-Schläuche werden an einem Ende markiert (z. B. mittels Kabelbinder) und mit einem Silikonadapter versehen, um den Anschluss der Spritze mit der Prüfanschmutzung zu ermögli-

Tabelle 1: Zusammensetzung des OPA-Reagenz (2-fach konzentriert).

Endvolumen OPA- Reagenz	50 ml
Dinatriumtetraborat	2,01 g
o-Phthaldialdehyd	80,0 mg
2- (Dimethylamino)ethanethiolhydrochlorid	200 mg
Methanol	2,00 ml
SDS-Lsg. 20 % in H ₂ O (w/w)	2,50 ml
H ₂ O	ad 50,0 ml

Tabelle 2: Zusammensetzung des Reagenz zur Bestimmung der Protein-Eigenextinktion (2-fach konzentriert).

Endvolumen Reagenz für Eigenfärbung	50 ml
Dinatriumtetraborat	2,01 g
Methanol	2,00 ml
SDS-Lsg. 20% in H ₂ O (w/w)	2,50 ml
H ₂ O	ad 50,0 ml

Tabelle 3: Verdünnungsschema für BSA-Standards zur Kalibrierung der OPA-Methode.

Standard-Nr.	Proteingehalt (µg BSA ml ⁻¹)	Volumen Standard	Volumen Lösungsmittel (1 % SDS-Lsg.)
1	1000	5,00 ml Stammlösung	-
2	500	5,00 ml Standard 1	5,00 ml
3	250	5,00 ml Standard 2	5,00 ml
4	125	5,00 ml Standard 3	5,00 ml
5	62,5	5,00 ml Standard 4	5,00 ml
6	31,3	5,00 ml Standard 5	5,00 ml
7	15,6	5,00 ml Standard 6	5,00 ml
8	7,8	5,00 ml Standard 7	5,00 ml
9	3,9	5,00 ml Standard 8	5,00 ml
10	0	-	5,00 ml

chen. Das Gewicht der so vorbereiteten Prüfkörperschläuche wird auf einer Waage bestimmt, danach werden die Schläuche horizontal ausgestreckt auf einem Tisch z. B. mit Klebeband fixiert.

10 ml der Prüfanschmutzung werden mit einer 10 ml Einmalspritze aufgezogen. Diese wird auf den Silikonadapter aufgesteckt und die Prüfanschmutzung in den PTFE-Schlauch injiziert. Nach 30 Sekunden Inkubation werden mit der Spritze zweimal hintereinander je 10 ml Luft aufgezogen und in den Schlauch injiziert, um überschüssige Prüfanschmutzung auszublasen. Die ausgeblasene Prüfanschmutzung wird am Ende des Prüfkörpers in einem Becherglas aufgefangen und zur Bestimmung des Koagulationszeitpunkts gelegentlich leicht geschwenkt. Eintretende Koagulation des Blutes zeigt sich durch

eine gelartig verfestigte Oberfläche beim Schwenken. Die benötigte Gerinnungszeit wird mittels der Stoppuhr bestimmt und zusammen mit der Raumtemperatur dokumentiert.

Der angeschmutzte Prüfkörper wird 1 Stunde waagrecht bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgt die Durchgängigkeitsprüfung. Hierzu werden 20 ml Luft in einer Spritze (20 ml Totalvolumen) aufgezogen und langsam in den Prüfkörper injiziert¹. Nachfolgend wird das Gewicht des Prüfkörpers auf der Waage ermittelt, um die Menge der enthaltenen Prüfanschmutzung zu bestimmen.

¹ In Abweichung zur Norm DIN ISO/TS 15883-5 wird hier eine Durchgängigkeitsprüfung nach der Kontamination vorgenommen.

3.1.3 Anwendung der Prüfkörper im RDG-E

Bei der Anwendung von Prüfkörpern in einem RDG-E ist darauf zu achten, dass eine flüssigkeitsdichte, drucksichere Verbindung zwischen PTFE-Schläuchen und RDG-E-Anschlüssen hergestellt wird und die Prüfkörper so angeschlossen werden, dass eine Durchströmung in derselben Richtung wie bei der Anschmutzung erfolgt.

3.1.4 Elution der Prüfkörper

Zur Quantifizierung der Anschmutzungsrückstände in Prüfkörpern, die in RDG-E-Prozessen behandelt wurden, oder auch von unbehandelten Kontrollprüfkörpern, wird eine Elution vorgenommen. Dazu werden 5 ml 1 % SDS-Lsg. in einer 10 ml Einzelspritze aufgezogen und in den Prüfkörper injiziert. Die Injektion erfolgt in derselben Richtung wie die Anschmutzung und die Durchströmung im vorhergehenden RDG-E-Prozess. Die zur Elution verwendete SDS-Lsg. wird in einem Becherglas aufgefangen und wieder in den Prüfkörper zurückgezogen. Anschließend wird die Spritze entfernt und die beiden Prüfkörperenden entweder mittels Silikonschlauchadapter ringförmig durch Verbinden geschlossen oder die beiden Enden einzeln mittels Verschlussknoten verschlossen und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nachfolgend wird die SDS-Lsg. in ein Becherglas gedrückt und nochmals in den Prüfkörper aufgezogen. Dieser Spülvorgang wird einmal wiederholt, danach der Prüfkörper entleert und durch Injektion von 3×20 ml Luft werden Reste der SDS-Lsg. ausgeblasen. Der Proteingehalt des Eluats wird mittels modifizierter OPA-Methode quantifiziert.

3.2 OPA-Methode

Die nachfolgenden Beschreibungen beziehen sich beispielhaft auf einen Messansatz von 1 ml, der entsprechend der verwendeten Geräte gegebenenfalls angepasst werden muss. Alle Lösungen müssen auf Raumtemperatur gebracht werden und alle Messungen werden als Dreifachbestimmungen bei einer Wellenlänge von $\lambda = 340$ nm durchgeführt, nachfolgend werden die Einzelmesswerte gemittelt.

3.2.1 Kalibrierung der OPA-Methode

Bei der Quantifizierung unbekannter Proteinlösungen wird die Proteinkonzentration als Äquivalent bezogen auf ein spezielles „Modell“-Protein angegeben. Hierzu wird Fraktion V des Bovinen Serum Albumins (BSA) verwendet. Die Kalibrierung

der OPA-Methode erfolgt mittels der entsprechend Tabelle 3 hergestellten BSA-Standards. Zur Messung werden 500 μ l des jeweiligen Standards zu 500 μ l des OPA-Reagenz (Tabelle 1) in eine Küvette pipettiert und gründlich gemischt. Nach 3 minütiger Inkubation erfolgt die Messung der Extinktion mit einem Photometer. Die Messung der Standards beginnt mit Standard-Nr. 10, der gemischt mit OPA-Reagenz als Reagenzienleerwert zur Nullung des Photometers dient (Auto-Zero, bzw. bei Zweistrahlphotometer Einbringen in den Referenzstrahl). Nachfolgend werden die Extinktionen (E) der übrigen Standards vermessen. Standards, die $E > 1,000$ ergeben, werden für die Kalibrierung nicht berücksichtigt.

Die Extinktionswerte der reinen BSA-Lösung (ohne OPA-Reagenz) müssen von den Extinktionswerten des BSA-OPA-Messansatzes subtrahiert werden. Hierzu werden 500 μ l des jeweiligen Standards zu 500 μ l des Reagenz zur Bestimmung der Proteineigenextinktion (Tabelle 2) pipettiert und gründlich gemischt. Die Bestimmung der Eigenextinktion erfolgt beginnend mit Standard-Nr. 10, der zur Nullung des Photometers verwendet wird. Die erhaltenen durchschnittlichen Protein-Eigenextinktionswerte der einzelnen Standards werden von den zuvor ermittelten jeweiligen Extinktionswerten der OPA-Reaktionsansätze subtrahiert. Für die so erhaltenen korrigierten Extinktionswerte wird eine Regressionsgrade berechnet ($y = mx + b$). Anhand dieser Geradengleichung wird der Proteingehalt unbekannter Proben berechnet.

3.2.2 Kontrolle der OPA-Methode

Zur Kontrolle der eingesetzten Chemikalien und angesetzten Lösungen erfolgt eine Vermessung des Leucin-Standards nach Kap. 2.2.3.4. Nach Nullung des Photometers mittels Reagenzienleerwerts werden 500 μ l des Leucin-Standards zu 500 μ l des OPA-Reagenz in eine Küvette pipettiert, gründlich gemischt und nach Inkubation für 3 Minuten die Extinktion bestimmt. Danach wird die Eigenextinktion des Leucin-Standards bestimmt und beide Extinktionswerte werden subtrahiert. Die gemittelte korrigierte Extinktion muss $E = 0,641 \pm 0,032$ betragen.

Eine weitere Kontrolle der OPA-Methode erfolgt durch Vermessung eines externen, kommerziell bezogenen BSA-Standards (Fraktion V), der eine vom Hersteller

präzise angegebene Konzentration im Bereich zwischen 100–200 μ g ml^{-1} aufweisen soll. Dieser extern bezogene Standard darf keiner Verdünnung oder sonstigen Veränderung unterzogen werden. Nach Nullung des Photometers werden 500 μ l des kommerziellen Standards zu 500 μ l des OPA-Reagenz gegeben. Die Lösungen werden gründlich gemischt und nach 3 Minuten Inkubation wird die Extinktion bestimmt. Schließlich wird die Eigenextinktion bestimmt und von der Extinktion der Probe mit OPA-Reagenz subtrahiert.

3.2.3 Quantifizierung von Proteinproben

Vor der Messung unbekannter Proteinproben erfolgt die Nullung des Photometers mittels Reagenzienleerwerts (Auto-Zero, bzw. Einbringen in Referenzstrahl). Anschließend werden die unbekanntesten Proteinproben vermessen. Hierzu werden 500 μ l der jeweiligen Proteinprobe zu 500 μ l OPA-Reagenz pipettiert. Die Lösungen werden gründlich gemischt, es erfolgt eine visuelle Kontrolle, dass keine Trübung/Präzipitation auftritt. Nach 3 minütiger Inkubation wird die Extinktion gemessen. Bei Extinktionswerten über 1,000 muss die zu vermessende Proteinprobe mit dem Lösungsmittel (1 % SDS-Lsg.) verdünnt werden.

Zur Berücksichtigung der Eigenextinktion der Proteinproben werden je 500 μ l der Proteinprobe zu 500 μ l des Reagenz zur Bestimmung der Eigenextinktion pipettiert und gründlich gemischt. Dabei wird die gleiche Konzentration der Proteinprobe wie bei der Vermessung mit OPA-Reagenz verwendet. Der erhaltene Durchschnittswert der Eigenextinktion wird von dem durchschnittlichen Extinktionswert des OPA-Messansatzes subtrahiert und mittels der Kalibrationsgerade die Konzentration der unbekanntesten Probe bestimmt.

4 Charakterisierung der Prüfkörper

4.1 Chargencharakterisierung

Jede Herstellungscharge von Prüfkörpern ist hinsichtlich ihrer Eignung zu prüfen durch:

- Negativkontrollen: Für jede verwendete Charge von PTFE-Schläuchen ist eine angemessene Anzahl von Negativkontrollen (unangeschmutzte PTFE-Schläuche) einer Elution und Proteinbestimmung zu unterziehen, um mögliche Einflüsse durch Produktionsfehler auszuschließen. In Abhän-

gigkeit von der bezogenen Chargengröße des PTFE-Schlauchmaterials sollten 1–3 Negativkontrollen untersucht werden.

- Positivkontrollen: Für jede hergestellte Prüfanschmutzung muss mindestens ein damit angeschmutzter Prüfkörper als Positivkontrolle (Prüfkörper, der keinem RDG-E-Prozess unterzogen wurde) einer Elution und Proteinbestimmung unterzogen werden, um die Eignung der verwendeten Prüfanschmutzung zu belegen. Hierbei muss eine Proteinwiederfindungsrate von über 70 % aber deutlich unter 100 % erreicht werden.

Die Proteinwiederfindungsrate (WFR) für Prüfkörper ergibt sich nach folgender Beziehung:

$$\text{WFR} = 100 * \frac{\text{RPG} (\mu\text{g})}{\text{PAM} (\text{ml}) * \text{PK} (\mu\text{g} * \text{ml}^{-1})}$$

RPG: Eluierter Restproteingehalt des Prüfkörpers in μg

PAM: gravimetrisch ermittelte Prüfanschmutzungsmenge im Prüfkörper in g, entspricht in Annäherung dem Volumen in ml bei einer angenommenen Dichte von $1,0 \text{ g ml}^{-1}$

PK: Proteinkonzentration der verwendeten Anschmutzung in $\mu\text{g ml}^{-1}$

4.2 Charakterisierung individueller Prüfkörper

Bei der Herstellung der Prüfkörper sind insbesondere alle Informationen (z. B. Hersteller, Lieferant, Lieferdatum, Produktnummer, Chargennummer) zum verwendeten Schafblut und den verwendeten PTFE-Schläuchen zu dokumentieren. Während des Herstellungsprozesses der Prüfkörper werden weitere folgende Daten dokumentiert:

- Raumtemperatur bei Herstellung
- Gerinnungszeit der Prüfanschmutzung
- Proteinkonzentration der Prüfanschmutzung
- Menge der Prüfanschmutzung in den Prüfkörpern nach Durchgängigkeitsprüfung

5 Auswertung der Prüfkörper

Durch Vermessung des Restproteingehalts von in RDG-E-Prozessen behandelten Prüfkörpern können folgende Angaben gemacht werden:

- Angabe des Restproteingehalts in behandelten Prüfkörpern
- Angabe des Reduktionsfaktors (RF) für die Entfernung der Prüfanschmutzung. Es handelt sich um den logarithmierten Quotienten aus der Proteinmenge des Prüfkörpers vor und nach der Behandlung im RDG-E-Prozess

6 Literatur

1. DIN ISO/TS 15883-5. Reinigungs-Desinfektionsgeräte – Teil 5: Prüfanschmutzungen und -verfahren zum Nachweis der Reinigungswirkung (ISO/TS 15883-5); Deutsche Fassung CEN ISO/TS 15883-5:2005. Berlin: Beuth Verlag; 2006
2. Frister H, Meisel H, Schlimme E. Einsatzmöglichkeiten der modifizierten OPA-Methode in der Proteinanalytik. *Ernährungs-Umschau* 1990;37(11):442–445.