

Quantifizierungsmethoden für proteinhaltige Restkontaminationen aufbereiteter Medizinprodukte

Dr. L. Schnieder
H. Hubert, Dr. J. Gauer, K. Roth



6. Kolloquium
Medizinische Instrumente
Aufbereitung, Werterhalt, Wiederverwertung

- Nachweis von Proteinen – aber wie?
- Chemisch oder Physikalisch?
- Einige Verfahren im Detail
- Vor- und Nachteile
- Diskussion

Nachweis von Proteinen – aber wie?

- Wiegen - eher unspezifisch und ungenau
- Nachweis spezifischer Merkmale wie z.B. Peptidbindung, Aminogruppen etc.....
- über „chemische“ Reaktion mit Nachweissubstanzen mit quantifizierbaren Auswirkungen (Färbung, Entfärbung etc.)
- Nutzung von Markern (spezifisch oder unspezifisch)
- Nachweis spezifischer Bestandteile, z.B. C- oder N-Atome
- Nachweis spezifischer Bestandteile und Merkmale (an Oberflächen)

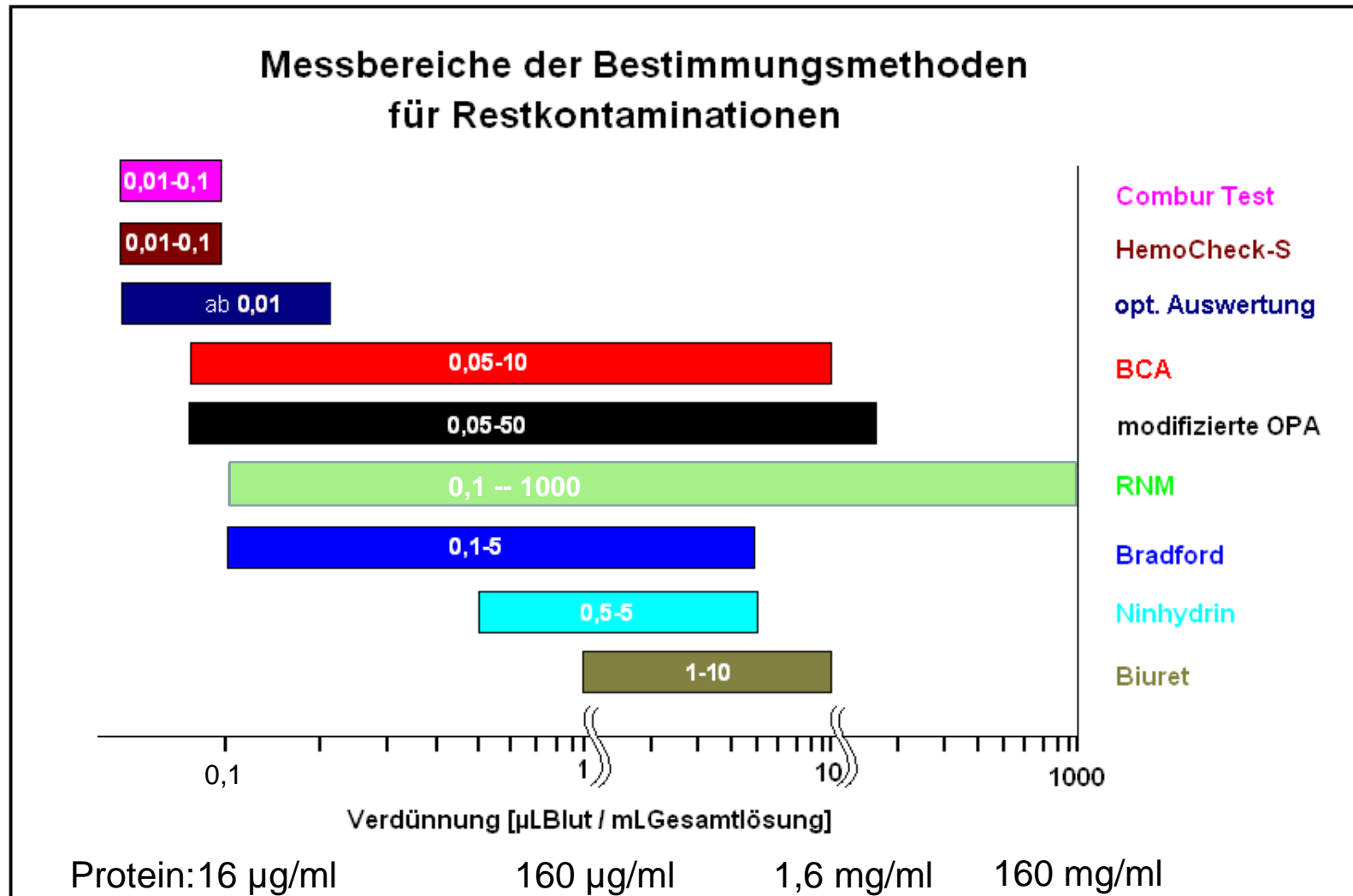
- Bradford-Methode
- Modifizierte OPA-Methode
- Biuret-Reaktion
- BCA-Protein Assay Kit
- Ninhydrin-Reaktion
- TOC (Total Organic Carbon)
- TNb (Total bound Nitrogen)
- Combur 3Test
- HemoCheck-S
- Photoelektronenspektroskopie (XPS)
- Radioaktive Markierung / Radionuklidmethode (RNM)

Chemisch?

- Bradford-Methode
- Modifizierte OPA-Methode
- Biuret-Reaktion
- BCA-Protein Assay Kit
- Ninhydrin-Reaktion
- TOC (Total Organic Carbon)
- TNb (Total bound Nitrogen)
- Combur 3Test
- HemoCheck-S
- Photoelektronenspektroskopie (XPS)
- Radioaktive Markierung / Radionuklidmethode (RNM)

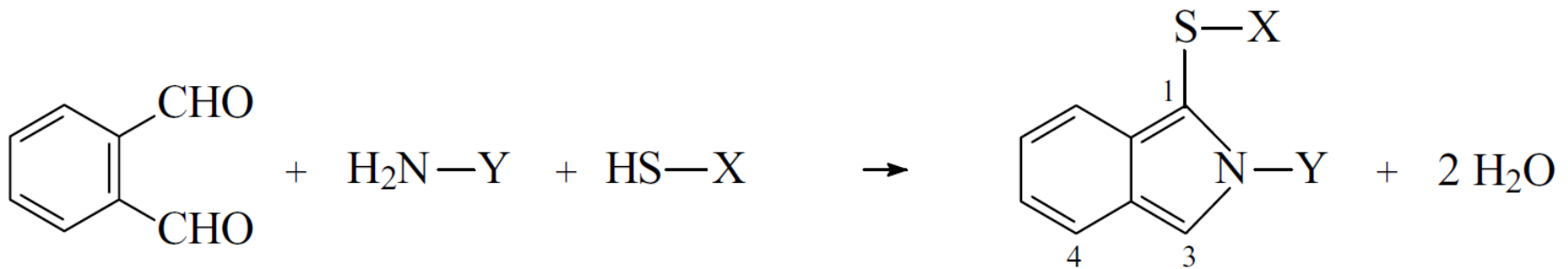
oder physikalisch?

- Bradford-Methode
- Modifizierte OPA-Methode
- Biuret-Reaktion
- BCA-Protein Assay Kit
- Ninhydrin-Reaktion
- TOC (Total Organic Carbon)
- TNb (Total bound Nitrogen)
- Combur 3Test
- HemoCheck-S
- Photoelektronenspektroskopie (XPS)
- Radioaktive Markierung / Radionuklidmethode (RNM)



Modifizierte OPA-Methode

Reaktion von α -Aminogruppen und ϵ -Aminogruppen (Lysin) mit OPA zu einem stabilen, fluoreszierenden Isoindol.



OPA

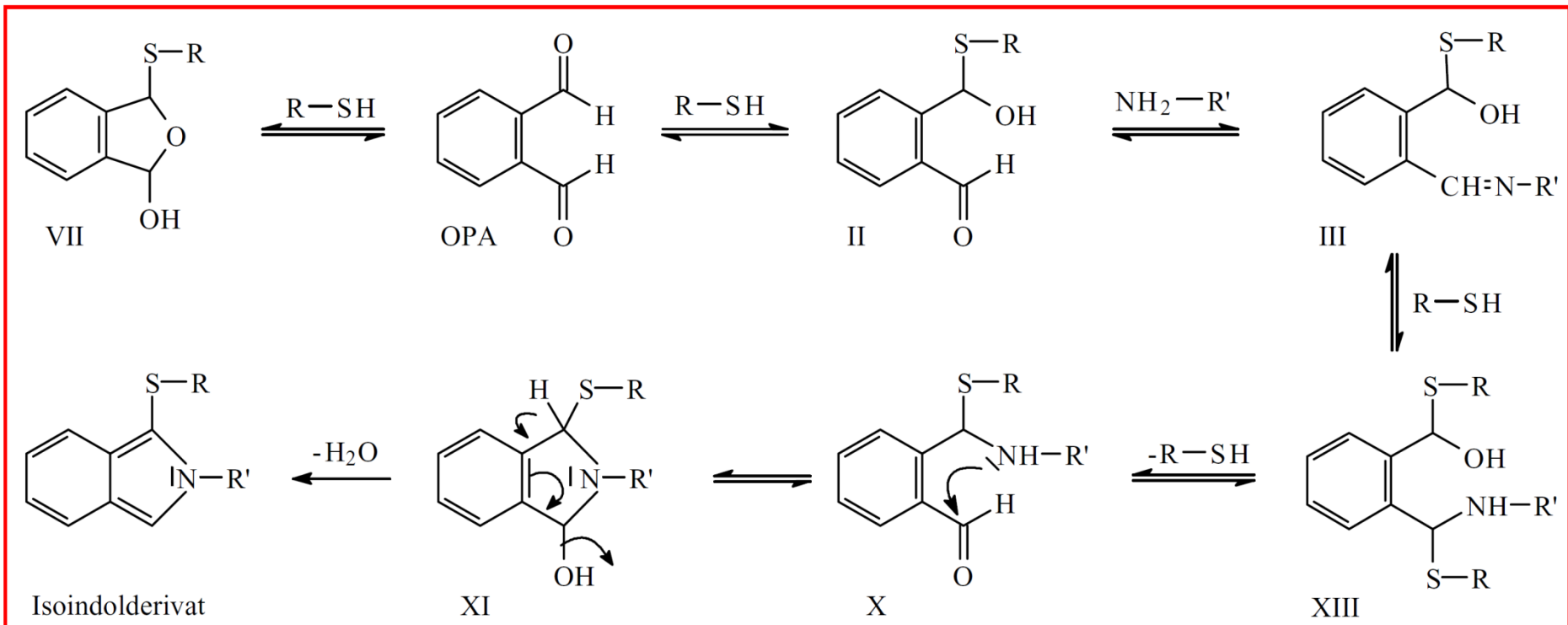
1-(Alkyl)thio-2-(alkyl)-
substituiertes Isoindol

Photometrischer Nachweis bei 340 nm (Absorption oder Fluoreszenz)

Nachweisgrenze \cong 1 – 5 μ g/ml

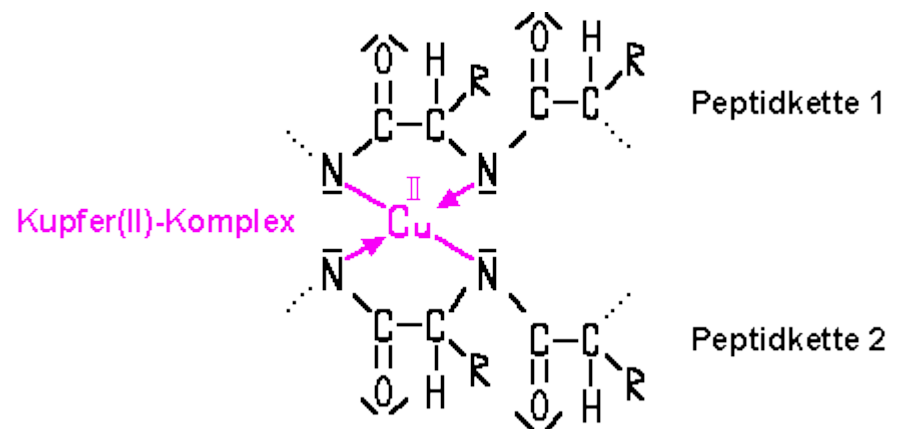
Extraktion/Elution mit SDS-Lösung

Modifizierte OPA-Methode



Biuret-Reaktion

- Bildung von Kupferkomplexen an Peptidbindungen in wässriger Lösung
- → Farbumschlag nach Violett
- unspezifische Reaktion
- Photometrische Messung (540 – 550 nm)

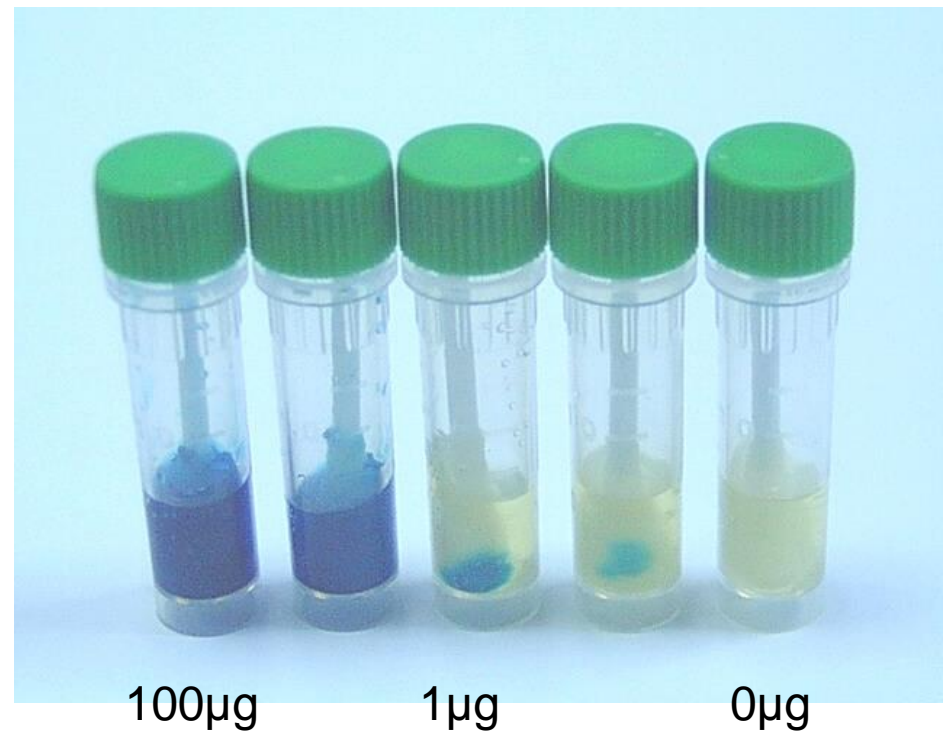


- Ähnlich Biuret-Reaktion
- Jedoch werden nicht die Cu^{2+} - Komplexe direkt gemessen, sondern die Zahl der verbliebenen Cu^{2+} -Ionen in der Lösung über eine Reduktion zu Cu^{+} und anschließende Komplexbildung
- → Die beobachtete Farbintensität ist der Proteinmenge umgekehrt proportional
- Messung photometrisch bei 562 nm
- Messbereich wird durch Konzentration der Lösungen vorgegeben

- Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blau bildet in saurer Lösung Komplexe mit Seitenketten (Arginin, Lysin) von Proteinen
- → Verschiebung des Absorptionsmaximum von 470 nm nach 595 nm
- Photometrische Bestimmung des Absorptionskoeffizienten bei 595 nm
- Farbreaktion hängt von der Art des Proteins ab
- → Kalibrierung
- SDS wirkt störend auf die Reaktion

- Hämoglobin katalysiert die Oxidation eines Indikators durch organisches H₂O₂ (im Teststreifen)
- Sehr empfindlich
- Nachweisgrenze bei 0,3 µg/ml
- Nachweis ist mit SDS-Elution verträglich

- Test Kit zum qualitativen Nachweis von Blutrückständen auf chirurgischen Instrumenten



TOC (Summenparameter)

- TOC: Nachweis des gesamten organischen Kohlenstoffs
- Oxidation des Kohlenstoffs (z.B. katal. Verbrennung) und Bestimmung des produzierten CO₂
- Nachweisgrenze bei ca. 15 µg/l (best case)
- TOC nicht mit einer SDS-Elution kompatibel, da zu viel Kohlenstoff enthalten

TNb (Summenparameter)

- TNb: Umsetzung des gebundenen Stickstoffs (z.B. in katalyt. Verbrennung) zu Stickoxid.
- Reaktion des NO mit O₃ zu NO₂*
- Messung der Chemilumineszenz zum quantit. Nachweis
- Messbereich bis zu µg/ml
- TNb mit einer SDS-Elution kompatibel

- Radioaktive Markierung einer Testanschmutzung
- Quantifizierung der aufgetragenen Anschmutzung
- Quantifizierung der zurückgebliebenen Anschmutzung
- Auffinden von Problembereichen
- Qualitätssicherung bei der Elution



Schafblut

+



^{99}Tc

+

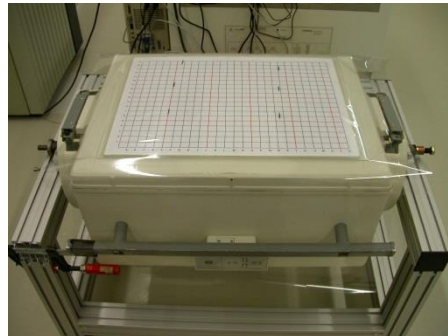


Protaminhydrochlorid

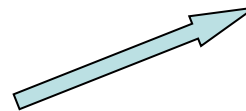
Radionuklidmethode



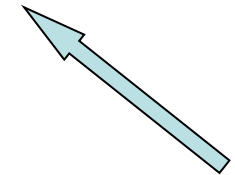
**Kontamination
der Proben**



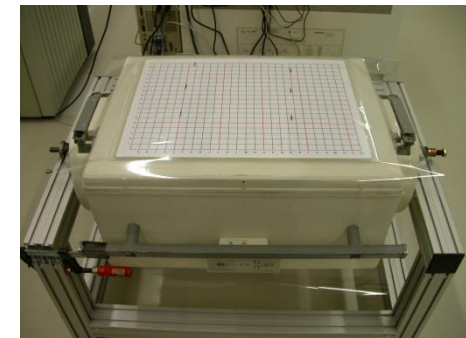
**Messung vor der
Reinigung**



Analyse

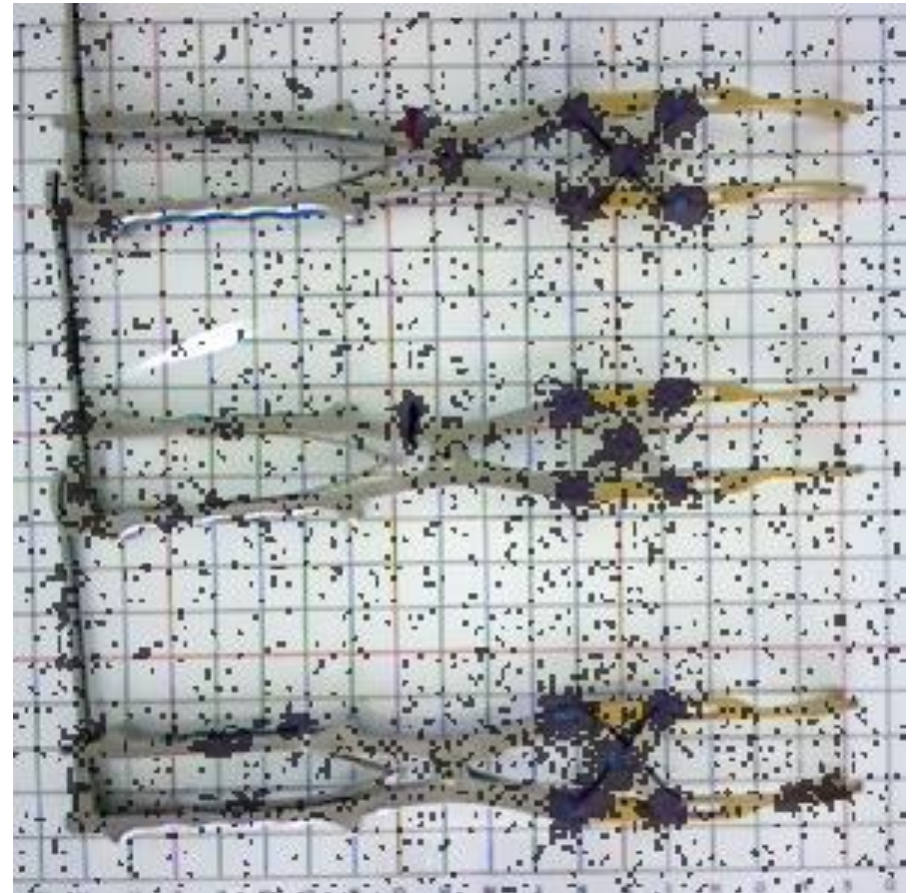
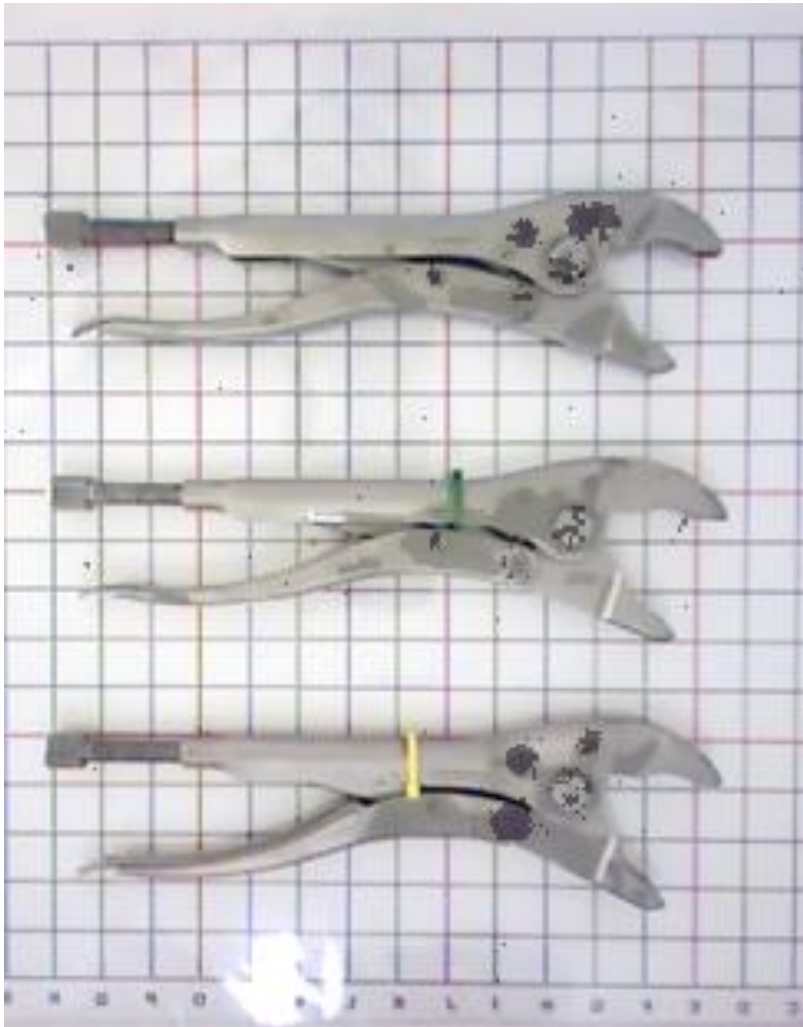


**Reinigung der
Proben**

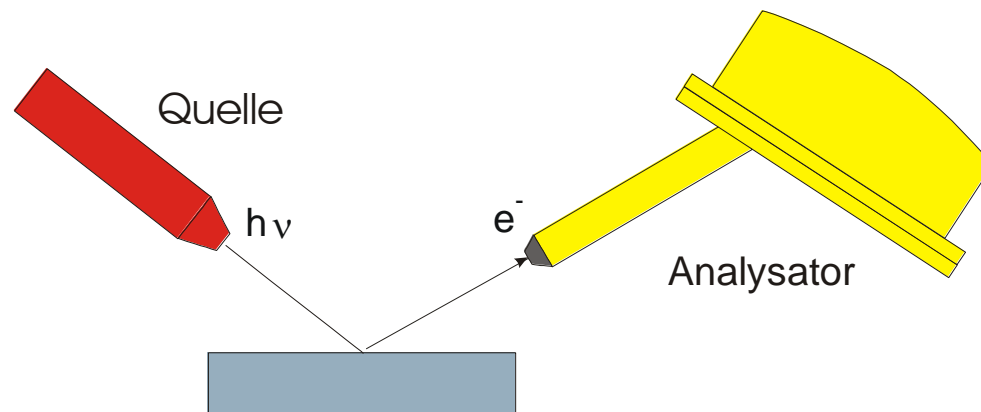


**Messung nach
der Reinigung**

Radionuklidmethode

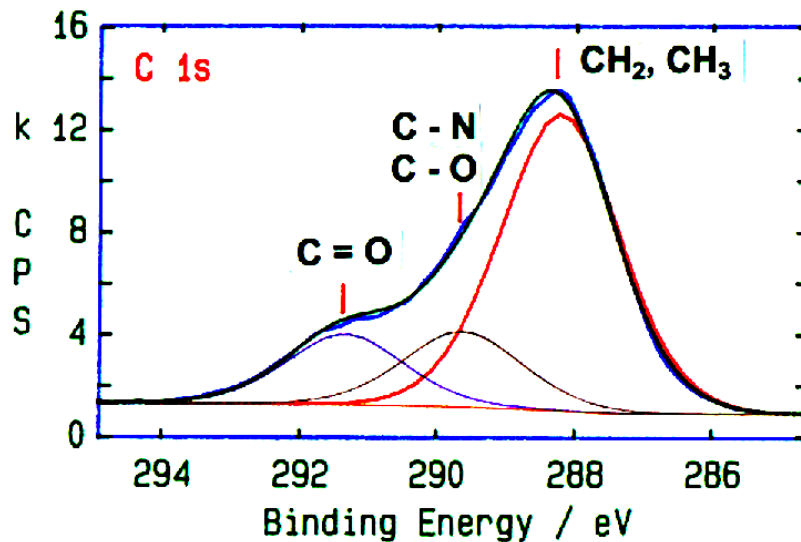


- Elektronen werden durch Bestrahlung mit Röntgenstrahlung aus der Oberfläche ausgelöst.
- Die Energie der Elektronen wird gemessen
- Aus der Energie kann sowohl auf das chemische Element als auch den Bindungszustand geschlossen werden.



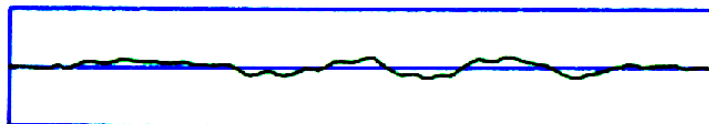
Photoelektronenspektroskopie (XPS)

NMI Analytik Peak Synthesis V.G.Scientific
24049602.DAT Region 2 / 6 Level 1 / 1 Point 1 / 1



Peak	Centre (eV)	FWHM (eV)	Hght %	G/L %	Area %
	288.3	2.08	93	39	67
	289.7	2.08	24	39	17
	291.4	2.08	22	39	16

100% Height (Counts) : 12482
100% Area (kceV/sec) : 37.70
Reduced Chi Squared : 3.00



10030 - Dr. Reichl

Ormocere-Coating : 04/D, contaminated

reprocessed [A] Kalpha, 240W, 35 mm, A3/13

Vor- und Nachteile

- Störanfälligkeit z.B. Proteine in Reinigungsmitteln
- Kalibrierung Blut \leftrightarrow BSA
- Anwendung vor Ort
- Quantifizierbarkeit
 - Radionuklidmethode
 - TOC / TNb
- Ortsauflösung
- Untersuchung von Zwischenschritten
- Elution als schwer zu kalibrierender und qualifizierender Zwischenschritt

- Durchführung an real kontaminierten Instrumenten
- Protein muss in Lösung gebracht werden (Elution)
- Benötigt speziell vorbereitete Testanschlusung /
Indirekter Nachweis
 - Markierung (z.B. RNM-Methode)
 - Markierung (mit Mikroorganismen)
- Kann vor Ort durchgeführt werden
- Reagiert „gleichartig“ auf alle (viele) Proteine
- Reagiert nur auf spezielle Proteine (z.B. Lysin) bzw.
besondere Teile eines Proteins (OPA-Methode)