

Hämoglobin als Analyt für die Bewertung der Reinigung

Winfried Michels

Die Reinigung von Medizinprodukten hat mit validierten Verfahren zu erfolgen (1). Das erfordert eine objektive Beurteilung der Entfernung unerwünschter Substanzen von deren äußeren und inneren Oberflächen. Als Analyt für die objektive Beurteilung der Reinigung gilt Protein. Da chirurgische Instrumente in der Regel mit Blut verschmutzt sind, kann auch Hämoglobin ein wichtiger und aussagefähiger Analyt bei der Beurteilung der Reinigung sein. In dieser Untersuchung wurde zunächst der Bezug der Färbung von Mikrohämaturie-Teststreifen zum mengenmäßigen Gehalt an Hämoglobin in Probelösungen hergestellt. Die Teststreifen erwiesen sich als sehr empfindlich und aufgrund der Beurteilung der Reinigung nach Elution der Instrumentenflächen mit 1%iger Natriumdodecylsulfatlösung (SDS) entspricht ein negativer Hämoglobinbefund in der Regel auch einem hinreichend von Protein befreitem Instrument.

Die Teststreifen ermöglichen bei blutverschmutzten Medizinprodukten somit eine

sehr empfindliche, einfache und preisgünstige Prüfung auf das Vorhandensein von Hämoglobin in SDS-Eluaten bei der Prüfung der Reinigung.

Einleitung

Die Reinigung von Medizinprodukten hat mit validierten Verfahren zu erfolgen (1). Das erfordert eine objektive Beurteilung der Entfernung unerwünschter Substanzen von deren äußeren und inneren Oberflächen in dem Ausmaß, wie es für die Wiederverwendung erforderlich ist. Da einerseits bekannt ist, dass schlecht gereinigte Medizinprodukte möglicherweise nicht hinreichend sicher desinfiziert bzw. sterilisiert werden und andererseits das wirklich erforderliche Ausmaß der Entfernung störender Substanzen nicht bekannt ist, gilt ein Optimierungsgebot nach dem Stand der Technik (2). Je sauberer die Medizinprodukte sind, umso sicherer sind die Maßnahmen der Desinfektion sowie der Sterilisation und die Wiederverwendung. Als Analyt für die objektive Beurteilung der Reinigung gilt Protein, welches bei operativen Eingriffen die umfassendste Substanzgruppe der vom Patienten stammenden Kontamination darstellt und somit in einschlägigen Empfehlungen, Richtlinien und Normen angeführt wird (3, 4). Da chirurgische Instrumente in der Regel mit Blut verschmutzt sind, kann auch Hämoglobin ein wichtiger und aussagefähiger Analyt bei der Beurteilung der Reinigung sein. Das Angebot analytischer Schnelltests ermöglicht dabei auch die Verwendung zur schnellen Routinekontrolle in der Praxis.

Es gibt einige Standardmethoden der Bestimmung des Hämoglobingehaltes von Blut. Das Hämoglobin im Blut ist in Form

SCHLÜSSELWÖRTER

- Reinigungsprüfung
- Hämoglobinbestimmung
- Hämoglobinschnelltest
- Akzeptanzkriterien

unterschiedlicher Hämoglobinvarianten vorhanden, so dass eine einfache photometrische Absorptionsmessung bei einer bestimmten Wellenlänge, z.B. 550 nm, nicht hinreichend genau ist. Die Hämoglobinvarianten müssen somit zunächst in eine Form überführt werden, z.B. in Cyanmethämoglobin oder in einen AHD (alkalischen Hämatin-Detergens)-Komplex (5). Diese Methoden haben Bestimmungsgrenzen im Bereich einiger hundert µg Hämoglobin pro Milliliter und sind für die Beurteilung der Reinigung nicht empfindlich genug. So wurden zur Beurteilung der Reinigung nach Elution der Instrumentenflächen mit 1%iger Natriumdodecylsulfatlösung (SDS) kommerzielle Teststreifen zur Prüfung auf Mikrohämaturie herangezogen (6, 7). Zusammen mit einem Tetramethylbenzidin (TMB)-Test sind diese Teststreifen im Anhang J der ISO/TS 15883-5 als hinreichend empfindliche halb-quantitative Methoden beschrieben (8). Diese Methoden stellen eine chemische Nachweisreaktion auf vorhandenes Hämoglobin intakter sowie hämolysierter Erythrozy-

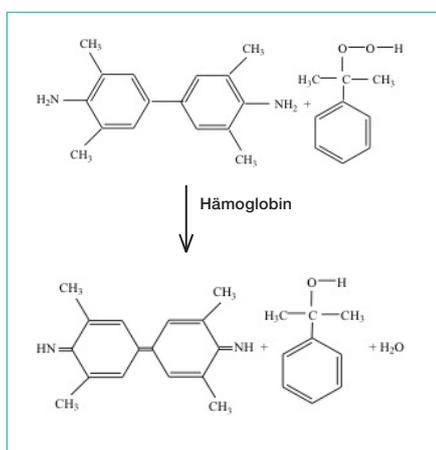


Abb. 1: Pseudoperoxidase-Reaktion des Hämoglobins überführt das Tetramethylbenzidin in ein farbiges Chromophor

Dr. Winfried Michels, Prüflabor DWM, Kasseler Tor 20, D-34414 Warburg.
E-mail: prueflabor-DWM@gmx.de

Lizenziert für AKI – Arbeitskreis Instrumenten-Aufbereitung. Weitergabe, Nachdruck oder elektronische Veröffentlichung nur mit Genehmigung des Verlages.
© mhp Verlag 2020

ten dar, die auf der Pseudoperoxidase-Aktivität des Hämoglobins beruht. Die Reaktion ist in Abbildung 1 dargestellt. Das Chromogen Tetramethylbenzidin wird in Gegenwart eines Peroxids, wie Cumolhydroperoxid oder Dimethylhexandihydroperoxid, in Anwesenheit von Hämoglobin zu einem blaugrünen Chromophor oxidiert. Das Hämoglobin katalysiert dabei sozusagen die Oxidationsreaktion ähnlich wie Enzyme (Peroxidasen), ohne selbst ein Enzym zu sein. Daher bezeichnet man die Eigenschaft des Hämoglobins auch als Pseudoperoxidase-Aktivität.

Dieser Pseudoperoxidasetest ist nur anwendbar, wenn die Instrumente wirklich mit Blut angeschmutzt waren. Bei Anwendung oxidativer Reinigungsprozesse kann der Test nicht oder bedingt angewendet werden, da geringste Restspuren Oxidationsmittel anhängig vom pH-Wert zu einer Verfärbung führen können und so fälschlich das Vorhandensein von Hämoglobin angezeigt wird, es also zu falsch-positiven Ergebnissen führt. Die Pseudoperoxidase-Aktivität wird zudem abhängig von den Prozesseinflüssen der Aufbereitung beeinflusst. Hitzebehandlung und hohe Alkalität führen partiell zu chemischen Änderungen des Hämoglobins und zur Abnahme der Aktivität (9).

Im Rahmen eines Feldtests mit 510 standardisiert mit Blut verschmutzten Crile-Klemmen als Prüfkörper und Bewertung deren Reinigung nach Probengewinnung durch intensives Spülen mit 2 ml 1% SDS-Lösung mittels Biuret/BCA-Methode sowie Teststreifen auf Mikrohämaturie konnte belegt werden, dass es eine deutliche Korrelation gibt und die Teststreifen sich für die orientierende Beurteilung eignen (10, 11).

In der Literatur finden sich einige Untersuchungen bei denen quantitative Hämoglobinbestimmungen durchgeführt wurden. Dabei wurde entweder lediglich auf das Protokoll des verwendeten Analysensystems hingewiesen, ohne die Bestimmungsmethode zu benennen, oder es wurde nur die TMB-Methode benannt, ohne diese genauer zu beschreiben (12, 13). Es gibt sogar einen Vorschlag für einen quantitativen Flächenbezug als Akzeptanzkriterium der Reinigung, welcher mit $2,19 \mu\text{g}$ Hämoglobin pro cm^2 angegeben wird (14). Es soll in dieser Arbeit mittels einer einfachen Methode der Hämoglobinquantifizierung bei Lösungen, wie sie bei der Probengewinnung mittels SDS-Elution erhalten werden, der Bezug der Färbung des Hämoglobinfeldes der Teststreifen zum Hämoglobingehalt des Eluats dargestellt und der Flächenbezug hinsichtlich des in der Diskussion befindlichen Akzeptanzwertes hergestellt werden.

Als quantitative kolorimetrische Methode der Hämoglobinbestimmung wurde ebenfalls eine Methode basierend auf der Oxidation von 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin angewendet (15). Der einfache Assay nutzt das Turbo TMB Substrat (Pierce Nr. 34022). Dieses ist gebrauchsfertig und enthält TMB und ein stabilisiertes Peroxid, welches bei 4°C aufzubewahren ist und vor Verwendung auf Raumtemperatur gebracht werden muss.

I Material und Methoden

Die Durchführung der Hämoglobinbestimmung ist sehr einfach. $200 \mu\text{l}$ der Hämoglobin bzw. Hämatin enthaltenden Probe werden mit $800 \mu\text{l}$ Turbo TMB versetzt und exakt 30 Minuten bei Raumtemperatur reagieren lassen. Hämoglobin enthaltende Proben führen dabei je nach Gehalt zu einer blauen Färbung. Damit die katalytische Reaktion gestoppt wird, wird nach den 30 Minuten $1000 \mu\text{l}$ 2M Schwefelsäure (VWR Nr. 198154D) hinzu pipettiert und vermischt. Die Reaktion mit der Säure führt zu einer gelbfarbigen Verbindung mit dem Absorptionsmaximum bei 450 nm . Bei dieser Wellenlänge werden die Absorptionen der Lösungen nach drei Minuten photometrisch gegen reines Wasser gemessen. Das Ergebnis der Nullprobe, d.h. der Reaktionsansatz mit $200 \mu\text{l}$ 1% SDS, als Mittelwert dreier Messungen

wird bei den Messergebnissen der Proben in Abzug gebracht. Als Kalibrator dient reines Häminchlorid (Sigma, H9039-1G). 50 mg werden in 10 ml einer Lösung von $0,02 \text{ N}$ Natriumhydroxid/1% SDS gelöst. Die Lösung wird zunächst 1000-fach verdünnt und diese sowie 1:1 Verdünnungen derselben für die Kalibration verwendet. Die Verdünnung erfolgt mit 1% SDS-Lösung pH 11. Zur Berechnung des Hämoglobingehaltes muss berücksichtigt werden, dass Häminchlorid als Monomer ein Molekulargewicht von $651,94 \text{ g}$ hat und Hämoglobin ein Tetramer mit einem Molekulargewicht von 64460 g ist. Die Hämingehalte sind demnach mit dem Faktor $24,72$ zu multiplizieren, um den Hämoglobingehalt zu erhalten. Die Verdünnungsstufen niedrigsten Hämingehaltes wurden mit den Teststreifen für die Prüfung auf Mikrohämaturie (Medi-Test Combi-5, Macherey–Nagel) getestet, wobei nur das endständige Reaktionsfeld für Hämoglobin hier von Relevanz ist. Nach Eintauchen in die Lösung führt die Pseudoperoxidasereaktion nach 30 Sekunden zu einer Färbung von gelb nach gelbgrün bei etwa $10 \text{ Erythrozyten}/\mu\text{l}$, nach blaugrün bei etwa $50 \text{ Erythrozyten}/\mu\text{l}$ und dunkel blaugrün bei etwa $250 \text{ Erythrozyten}/\mu\text{l}$ (Abb. 2).

Die Durchföhrung der Hämoglobinbestimmung ist sehr einfach. $200 \mu\text{l}$ der Hämoglobin bzw. Hämatin enthaltenden Probe werden mit $800 \mu\text{l}$ Turbo TMB versetzt und exakt 30 Minuten bei Raumtemperatur reagieren lassen. Hämoglobin enthaltende Proben föhren dabei je nach Gehalt zu einer blauen Färbung. Damit die katalytische Reaktion gestoppt wird, wird nach den 30 Minuten $1000 \mu\text{l}$ 2M Schwefelsäure (VWR Nr. 198154D) hinzu pipettiert und vermischt. Die Reaktion mit der Säure föhrt zu einer gelbfarbigen Verbindung mit dem Absorptionsmaximum bei 450 nm . Bei dieser Wellenlänge werden die Absorptionen der L6sungen nach drei Minuten photometrisch gegen reines Wasser gemessen. Das Ergebnis der Nullprobe, d.h. der Reaktionsansatz mit $200 \mu\text{l}$ 1% SDS, als Mittelwert dreier Messungen

I Ergebnisse

Die Hämatinchlorid-L6sung von $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ wurde in f6nf Stufen 1:1 mit 1% SDS-L6sung bis zu $0,078 \mu\text{g}/\text{ml}$ verd6nnt. Das entspricht Hämoglobinkonzentrationen von $123,75 - 61,88 - 30,94 - 15,49 - 7,75 - 3,88 \mu\text{g}/\text{ml}$. Die h6chste Konzentration föhrt bei der TURBO TMB-Methode nach Zugabe der Schwefelsäure zu einer tief gel-

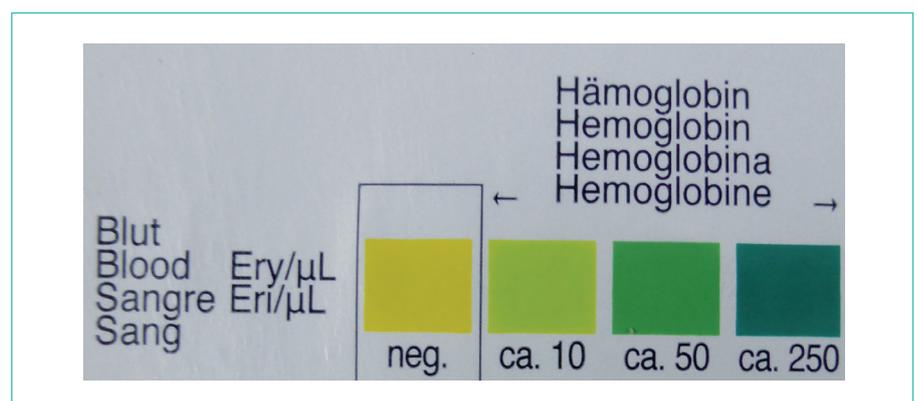


Abb. 2: Farbvergleichstafel für die Hämoglobin-Reaktionszone des Medi-Test Combi-5

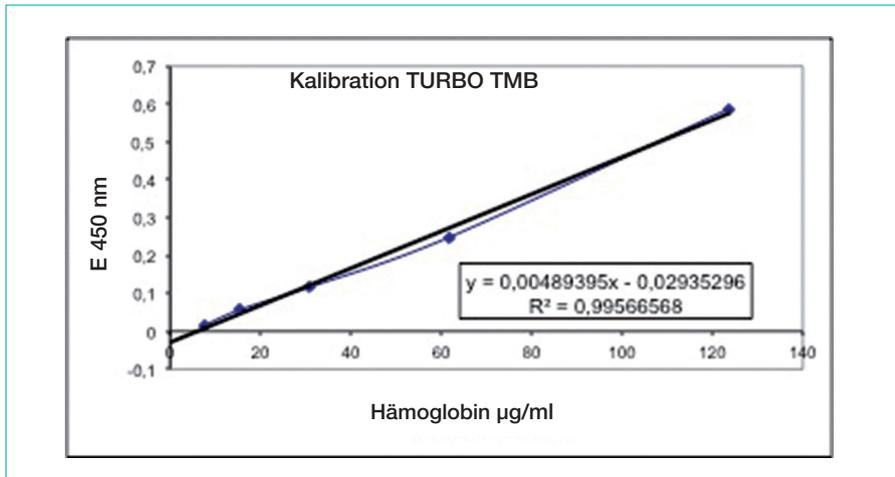


Abb.3: Kalibrierung der Turbo TMB-Methode mit Häminchlorid, welches in die äquivalente Hämoglobinkonzentration umgerechnet ist.

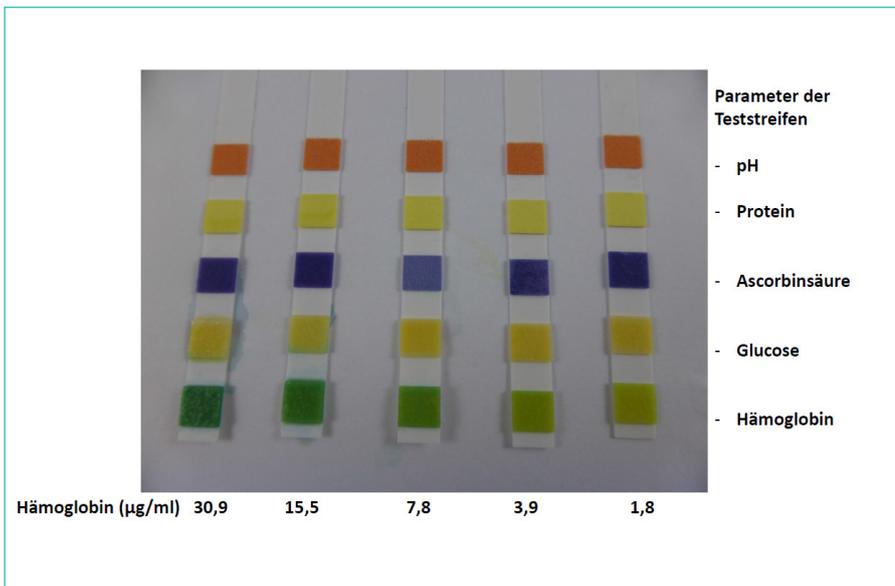


Abb.4: Färbung der Hämoglobin-Reaktionszone in Abhängigkeit von der Hämoglobinkonzentration

der Teststreifen sind nicht relevant und auch die Reaktionszone für Protein ist für die Prüfung von SDS-Eluaten nicht hinreichend empfindlich. Die Hämoglobinzone der Stäbchen erwies sich als ausgesprochen empfindlich und die Konzentration von 3,9 µg/ml Hämoglobin führte bereits zu einer hellgrünen Färbung entsprechend 10 Erythrozyten pro µl. Im Bereich 7,75 µg/ml bis 15,5 µg/ml Hämoglobin resultiert dann eine blaugrüne Färbung entsprechend 50 Erythrozyten pro µl (Abb. 4).

I Diskussion

Die TURBO TMB-Methode, so wie sie hier angewendet wurde, hat eine Bestimmungsgrenze von etwa 8 bis 10 µg pro ml Eluat. Das ist empfindlich genug, um beispielsweise bei einer Crile-Klemme, welche gemäß der Leitlinie von DGKH, DGSV und AKI mit 2 ml 1% SDS-Lösung eluiert wird und wobei knapp 20 cm² Fläche beprobt werden, Restmengen von größer 1,0 µg pro cm² zu detektieren. Die Teststreifen auf Mikrohämaturie erwiesen sich als deutlich empfindlicher. Die Packungsbeilage des Schnelltests gibt eine erste Erkennbarkeit einer Färbung bei 0,15 µg pro ml an. In Verbindung mit einer reflektometrischen Methode konnten mit solchen Teststreifen sogar Hämoglobingehalte im Nanogramm-Bereich quantifiziert werden (16). Die Teststreifen ermöglichen bei blutverschmutzten Medizinprodukten somit eine sehr empfindliche, einfache und preisgünstige Prüfung auf das Vorhandensein von Hämoglobin in SDS-Eluaten bei der Prüfung der Reinigung. Weist die Reaktionszone keine Verfärbung auf, dann ist auch keine Quantifizierung sinnvoll. Nur solche Eluate sind gegebenenfalls einer quantitativen Bewertung des Hämoglobingehaltes zuzuführen, bei denen die Reaktionszone eine deutliche Blaugrünfärbung aufweist. Für die Quantifizierung bietet sich dann u.a. die Turbo TMB-Methode an. Wie oben erwähnt wurde bei einem Feldtest zur Festlegung der Akzeptanzkriterien der Leitlinie von DGKH, DGSV und AKI für Restprotein beim Prüfkörper Crile-Klemme die Prüfmethode mit den Mikrohämaturie-Teststreifen mit angewendet (10, 11). Bei den 510 geprüften Instrumenten ergaben bei Restproteinbefunden über 100 µg Protein die Teststreifen zu 92% eine dunkel blaugrüne Färbung entsprechend größer 30 µg Hämoglobin pro ml Eluat. Instru-

ben Lösung, die mit niedrigeren Konzentrationen heller wird und bei 15,49 µg/ml nur noch eine blass gelbliche Lösung ergibt. Dieses ermöglicht schon orientierend eine optische Beurteilung des Hämoglobingehaltes. Die Nullprobe ergab eine Extinktion von 0,273 +/- 0,006 und die Probe mit 3,88 µg/ml als Hämoglobin eine Extinktion von 0,271 +/- 0,011. Der Bereich unter 10 µg Hämoglobin/ml ist verbunden mit größeren Schwankungen bei den Extinktionsmessungen, was möglicherweise durch Konzentrationseffekte aufgrund der Pipettiertoleranzen bedingt ist. Die Mes-

sungen bei den gelb gefärbten Lösungen sind konsistent und es scheint sinnvoll nur solche Reaktionsansätze photometrisch auszuwerten, die zumindest eine hellgelbe Färbung aufweisen. Die Eigenextinktionen erwiesen sich bei den Konzentrationen der Proben als vernachlässigbar (<0,004) (Abb. 3).

Die Hämatinchlorid-Lösungen mit den oben angegebenen Hämoglobinäquivalenten wurden mit den Teststreifen auf Mikrohämaturie geprüft. Dabei wurde nur das endständige Hämoglobinfeld in die Lösung getaucht. Die anderen Parameter

Lizenziert für AKI – Arbeitskreis Instrumenten-Aufbereitung. Weitergabe, Nachdruck oder elektronische Veröffentlichung nur mit Genehmigung des Verlages.
© mhp Verlag 2020

Häufigkeit der Befunde des Hämoglobin-Teststreifens im Verhältnis zur Restproteinmenge

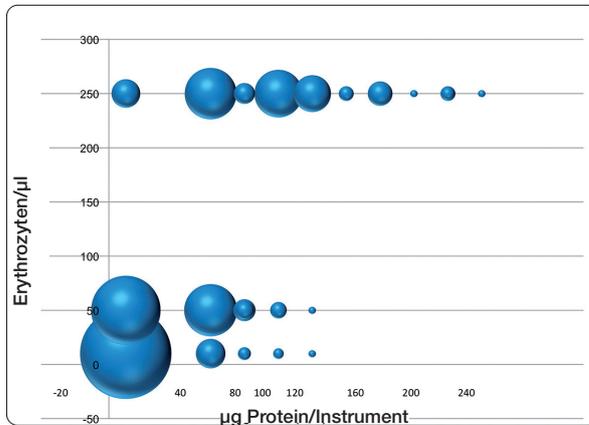


Abb. 5: Häufigkeit von Protein- und Hämoglobinbefunden

mente, die weniger als 50 µg Restprotein aufwiesen, ergaben zu 96,6% auch keine Färbung der Hämoglobin-Reaktionszone der Teststreifen (Abb.5).

Die Crile-Klemmen haben eine Gesamtfläche von etwa 42–44 cm² (17). Bei der Elution gemäß der Leitlinie von DGKH, DGSV und AKI wird etwa die Hälfte der Fläche (nur der Funktionsbereich einschließlich Gelenk) beprobt (18). Das sind knapp 20 cm². Bezogen auf den Vorschlag, als Akzeptanzkriterium 2,19 µg Hämoglobin pro cm² für die Reinigungsbewertung anzusetzen, wären dann 43,8 µg Hämoglobin im Eluat von 2 ml 1% SDS-Lösung, die für die Probengewinnung bei den Klemmen eingesetzt werden, akzeptabel. Somit sind das 21,9 µg pro ml Eluat, was bei den Teststreifen zu einer intensiven Blaugrünfärbung führen würde. Diese Färbung korreliert dann in Bezug auf den Feldtest eher mit Restproteingehalten von deutlich größer 60 µg, was bei einem Akzeptanzkriterium von <3 µg Protein pro cm² nicht mehr akzeptabel wäre. Da gibt die Leitlinie 50 µg als Akzeptanzwert vor. Aufgrund der Ergebnisse mit den Crile-Klemmen und von der Praxiserfahrung mit den Teststreifen her, wäre nur eine hellgrüne Färbung bei Eluaten adäquat gereinigter Medizinprodukte akzeptabel, die bei <7,8 µg Hämoglobin pro ml bzw. zumindest <10 µg pro ml liegt. Somit könnte als Akzeptanzkriterium bestenfalls nur etwa 1 µg Hämoglobin pro cm² oder weniger angesetzt werden. Die Daten, die dem Vorschlag von

2,19 µg/cm² zugrunde liegen, wurden bei einer Untersuchung von 30 flexiblen Endoskopen gewonnen (12). Diese doch recht begrenzte Zahl kann nicht repräsentativ für alle Medizinprodukte sein und erst recht nicht auf chirurgische Instrumente aus Edelstahl, wie die Arterien-Klemme, übertragen werden. Zudem läge der vorgeschlagene Akzeptanzwert nicht sehr viel niedriger als der für das tolerierbare Restprotein. Das kann nicht richtig sein, denn wir haben doch die Erfahrung, dass nach der Reinigung vom Blut noch Proteinreste, wie Fibrinfilme, verbleiben und das Hämoglobin sehr gut extrahiert wurde.

Bei Instrumenten mit Blutverschmutzung ist bei Prüfung der SDS-Eluate mit den Teststreifen auf Mikrohämaturie eine empfindliche, einfache und schnelle Prüfung der Reinigung orientierend möglich. Sie sollte daher eine wichtige Methode der Routineprüfung der Reinigung blutverschmutzter Instrumente in der Praxis darstellen. Die dazu erforderliche 1%ige SDS-Lösung und die Teststreifen sind über die Krankenhausapotheke erhältlich. Wichtig ist, dass die zu prüfenden Instrumente bei thermischen Prozessen vor der Desinfektionsstufe dem Reinigungs-Desinfektionsgerät entnommen werden. Dieses Unterbrechen eines Prozesses für Routinekontrollen stellt sich leider hinsichtlich der Durchführung und der Prozessdokumentation immer wieder als Problem dar und bedarf klärender Diskussion. ■

Literatur

1. Verordnung über das Errichten, Betreiben und Anwenden von Medizinprodukten (MPBetreibV) BGBl.I
2. Michels W: Acceptance criteria for the cleaning of medical devices. Forum 2015; Vol. 25: 9–10.
3. Anforderungen an die Hygiene bei der Aufbereitung von Medizinprodukten (KRINKO/BfArM). Bundesgesundheitsblatt 2012; 55: 1244–1310.
4. EN ISO 15883-1: 2006/Amd1: 2014 – Washer-disinfectors – Part 1: General requirements, terms and definitions and tests
5. DIN 58931: 2010-8 – Hämatologie – Bestimmung der Hämoglobinkonzentration im Blut.
6. Michels W: Evaluation of a quick test for examining cleaning efficiency of processed surgical and minimally invasive instruments. Hyg Med 1997; 22 (4): 173–184.
7. Fengler TW, Pahlke H, Bisson S, Michels W: Are processed surgical instruments free of protein? Zentr Steril 2001; 9 (1): 20–32.
8. ISO/TS 15883-5: 2005 – Washer-disinfectors – Part 5: Test soils and methods for demonstrating cleaning efficacy.
9. Michels W: Detektionsmethoden der EN ISO 15883 für die Reinigungsprüfung in der Praxis. Aseptica 2006; 12 (2): 7–9.
10. Roth K, Michels W: Inter-hospital trials to determine minimal cleaning performance according to the guideline by DGKH, DGSV and AKI. Zentr Steril 2005; 13 (2): 106–116.
11. Michels W: Leistungsprüfung der Reinigung – Probleme der Praxis und Alternativen. Aseptica 2010; 16 (4): 14–16.
12. Alfa MJ: Worst-case soiling levels for patient-used flexible endoscopes before and after cleaning. Am J Infect Control 1999; 27: 392–401.
13. Alfa MJ, Olson N, Al-Fadhaly A: Cleaning efficacy of medical device washers in North America healthcare facilities. J Hosp Infect 2010; 74: 168–177.
14. A compendium of processes, materials, test methods and acceptance criteria for cleaning reusable medical devices. AAMI TIR30: 2011.
15. Huy NT et al.: An improved colorimetric method for quantitation of heme using tetramethylbenzidine as substrate. Anal Biochem 2005; 344: 289–291.
16. Frey J et al.: Hemoglobin assay for validation and quality control of medical device reprocessing. Anal Bioanal Chem 2015; 407: 6885–6889.
17. Michels W, Roth K, Eibl R: Assessment of cleaning efficacy based on the protein-surface relationship. Zentr Steril 2013; 21: 212–215.
18. Leitlinie von DGKH, DGSV und AKI für die Validierung und Routineüberwachung maschineller Reinigungs- und thermischer Desinfektionsprozesse für Medizinprodukte (4. Auflage). Zentr Steril 2014 Supplement