

Evaluación comparativa del efecto de los parámetros del proceso y de los detergentes enzimáticos en el reprocesamiento mecánico

Winfried Michels

prueflabor-DWM@gmx.de

Introducción

Para el reprocesamiento del instrumental quirúrgico en las lavadoras desinfectadoras (LD), hoy en Europa se utilizan sobre todo detergentes alcalinos suaves, detergentes enzimáticos y detergentes que contienen tensioactivos para la etapa de limpieza. Así se satisface el deseo del operario de utilizar en la medida de lo posible solo una química de proceso para todos los productos sanitarios que necesiten reprocesamiento con los procesos definidos consiguientes. Estos detergentes alcalinos suaves con un pH cercano a 10, en la concentración de uso, son compatibles con el acero inoxidable, los plásticos, los elastómeros e incluso el aluminio. Por regla general, estos detergentes se utilizan en las condiciones habituales de limpieza especificadas por los fabricantes. Las recomendaciones de aplicación emitidas por los fabricantes de la química de los procesos son tan vagas que se pueden aplicar casi a cualquier proceso, incluso a LD diferentes de distintos fabricantes. Así, por ejemplo, se recomienda una concentración de 2 a 10 ml/l de un determinado producto (se indica que la concentración depende del grado de suciedad o contaminación) y se establece el tratamiento con una temperatura de 40 a 60°C durante 10 minutos. Este espectro tan amplio de condiciones plantea dudas acerca de la eficacia real de estas recomendaciones para una limpieza eficiente. Si las enzimas contribuyeran de modo notable a la limpieza, cabría esperar unas condiciones más concretas y rigurosas pues su efecto depende de la temperatura y del pH.

Hasta la fecha, no existen requisitos normativos sobre los detergentes empleados para el reprocesamiento de productos sanitarios y tampoco métodos de análisis y evaluación de su rendimiento. La serie de normas ISO EN 15883 relativas a las LD solo exige, con respecto a las condiciones de uso, que la dosificación del producto de limpieza se lleve a cabo con un margen de tolerancia de +/- 5 por ciento en volumen y que la temperatura se encuentre dentro de la franja térmica de limpieza (con un margen de 10 °C respecto de los límites inferior y superior definitivos); dentro de la carga no debe diferir en más de 5 °C. Estos requisitos quizá resulten demasiado rigurosos para la dosificación y demasiado

benevolentes para la temperatura de limpieza. Para hacerse una idea del rendimiento de dos detergentes comerciales enzimáticos alcalinos suaves, aplicados en diferentes concentraciones y temperaturas, se realizaron ensayos con el aparato del grupo Ad Hoc de DIN (1).

Material y métodos

El baño de tratamiento se realiza en un recipiente de 150 ml que se llena de 150 ml de la solución detergente examinada. Este se temple en un agitador magnético con calefacción y control de temperatura (C-MAG HS7, Carl Roth, Karlsruhe). Cuando se estabiliza la temperatura ajustada, se mantiene dentro de un margen de +/- 1 °C. El baño se moviliza a 300 revoluciones por minuto con una varita magnética agitadora recubierta de teflón (longitud de 35 mm y diámetro de 6 mm) (n.º de pedido 1292, Carl Roth, Karlsruhe). Esta agitación se corresponde con el desbordamiento de la solución de lavado sobre el producto sanitario que se desea limpiar; este último no recibe los chorros directos o indirectos de lavado de las lavadoras desinfectadoras (LD), es decir, simula una situación bastante real. La figura 1 muestra cómo se realiza la prueba.

Las placas de acero inoxidable 1.4301 de 75 mm de longitud y 25 mm de anchura (con un rectificado longitudinal de grano 80) se utilizan como muestras. Estas muestras se contaminan con 50 µl de sangre heparinizada de oveja (n.º de artículo 2132005, ACILA GmbH, Mörfelden), que se reactiva inmediatamente antes con sulfato de protamina. La contaminación se efectúa con una plantilla según el método publicado por Brill y cols. (2). A continuación, las muestras de ensayo se acondicionan en el desecador a 30 °C sobre una solución saturada de carbonato de potasio durante 24 horas. Las muestras se exponen por separado en el centro del recipiente a la temperatura y concentración correspondientes del ensayo durante un período efectivo de 10 minutos. Este se corresponde con la exposición habitual en las LD durante el período efectivo de la etapa de limpieza. A continuación, se retiran las muestras del soporte, se enjuagan con cuidado por ambos lados con unos 5 ml de agua purificada de un frasco de lavado del laboratorio y se colocan en una superficie absorbente para su secado a temperatura ambiente. Para

la toma de muestras, se llevan las muestras secas a un recipiente de 500 ml de manera que la superficie contaminada con el residuo mire hacia el fondo del recipiente. Se pipetea luego 5 ml de una solución de dodecilsulfato sódico (SDS) al 1 %, se sumergen los vasos de precipitados a una profundidad de 4 a 5 cm en un baño de ultrasonidos (SONOREX RK 102H, Bandelin, Berlín) y se balancean con suavidad para que las muestras floten ligeramente. La solubilización de los residuos de suciedad tiene lugar a una temperatura regulada del baño de 45 °C durante 2 minutos. La humectación de las muestras eluidas con una solución acética Ponceau S no coloreó ningún residuo de proteína. Se añade una porción alícuota de la solución resultante para cuantificar la proteína.

Como los detergentes contienen aminas primarias como ingredientes y estas producen falsos resultados con el método OPA y como el lavado con agua purificada no está normalizado, se utiliza el método universal BCA modificado Roti®-Quant (artículo 0120.1, Carl Roth, Karlsruhe) con medición fotométrica a 503 nm, que proporciona una sensibilidad suficientemente alta y una linealidad adecuada. El límite de determinación es de aproximadamente 4,0 µg de proteína (BSA) por ml de solución SDS al 1 %.

En las investigaciones se utilizaron tres productos de limpieza (caracterizados según las especificaciones del fabricante):

- A: detergente enzimático alcalino suave con tensioactivos (pH ligeramente superior a 10)
- B: detergente alcalino suave según A, pero sin enzimas (pH ligeramente superior a 10)
- C: detergente con compuestos alcalinos, enzimas y tensioactivos (valor pH ligeramente superior a 10)

Resultados

Para determinar la tasa de recuperación de la contaminación descrita en las muestras recogidas, se determinó en primer lugar la cantidad de proteína en 50 µl de sangre. Para ello, se añadieron directamente 50 µl de sangre heparinizada de oveja y reactivada a 10 ml de solución SDS al 1% con pH 11 y se extrajo una porción alícuota para la determinación. Con tres métodos independientes se obtuvo resultado un valor medio de 8006 µg de

Comparative evaluation of the effect of process parameters as well as enzymatic detergents in automatic reprocessing

Winfried Michels

prueflabor-DWM@gmx.de



Fig. 1: Dispositivo de prueba para comprobar el efecto de la limpieza / Experiment design to test cleaning effectivity

Introduction

Currently in Europe reprocessing of surgical instruments in washer-disinfector appliances (WDs) makes use of detergents for cleaning that are primarily mildly alkaline, enzymatic and contain tensides. This is to accommodate the operator aspiration, that where possible only one process chemical is needed for all medical devices being reprocessed by any of the various processes laid down for use. These mildly alkaline detergents with a pH of about 10 in the concentration used are compatible with stainless steel, plastics, elastomers and even aluminium. As a rule these detergents are used in line with the cleaning conditions in standard processes laid down by the manufacturers. The recommendations for use given by the manufacturers of the process chemicals are so broadly painted, that they can be used in practically every given process of different WDs made by various manufacturers. So for example, for one product a concentration of 2 – 10 ml/l and a temperature of 40 to 60 °C is recommended for 10 minutes holding time, depending on the level of soiling. This broad spectrum of possible parameters raises doubt about whether the recommendations are really targeted at efficient cleaning. If enzymes provide a meaningful addition to cleaning, then you

would expect more concrete and limited conditions for temperature and pH dependence.

Even today there are no normative requirements for detergents for reprocessing medical devices and also no tests or evaluation methods for performance ability. The relevant standard series for WDs ISO EN 15883 only requires with regard to operational conditions, that the detergent dosage clearly stays within a tolerance of +/- 5 percent volume and the temperature remains within the cleaning temperature band. This spans 10 °C between the specified lower limit and the upper limit, however within the load it may not vary more than 5 °C. These requirements are possibly too restrictive with regard to dosage and too generous with regard to cleaning temperature.

In order to gain insight into the performance of two commonly used mildly alkaline, enzymatic detergents at various concentrations and temperatures, tests were carried out using a test design based on the test apparatus of the DIN Ad hoc group (1).

Materials and methods

A 150 ml glass beaker served as a treatment bath, which was filled with 150 ml of the detergent solution to be tested. This is brought to the right temperature on a magnetic stirrer with in-built heating element (C-MAG HS7, Carl Roth, Karlsruhe). When the pre-set temperature has been reached, it is maintained with a tolerance of +/-1 °C. The bath is stirred with a Teflon-coated magnetic stirrer, which is 35mm long and has a diameter of 6 mm (Order no. 1292, Carl Roth, Karlsruhe) using 300 revolutions per minute. This movement equates to rinse solution flowing over a medical product being cleaned, reached neither by direct or indirect rinse jets in a washer-disinfector (WD). That is a situation which does certainly arise in the practical situation. Figure 1 shows the test design.

Stainless steel plates 1.4301, 75 mm long and 25 mm wide with a longitudinal slit and grain size of 80 were used as test objects. These test objects were each soiled with 50 µl heparinised sheep's blood (Article No. 2132005, ACILA GmbH, Mörfelden), which was reactivated immediately before use with protamine sulphate. Soiling was carried out with a template in line with the published method by Brill and others. (2). Afterwards the test objects were condi-

tioned in a desiccator at 30 °C over saturated potassium carbonate solution for 24 hours.

The exposition of each test object follows centrally in a glass beaker at the relevant test temperature and in the relevant test concentration, with a holding time of 10 minutes. This corresponds to the normal exposition in the WD during the holding time of the cleaning stage. Finally the test objects are removed from the holders, carefully rinsed on each side with about 5 ml fully demineralised water using a laboratory spray bottle and put to dry in ambient air on an absorbent pad. To take samples, the dried test objects are each transferred to a 500ml glass beaker specifically with the surface with residual soil facing towards the bottom of the glass. 5 ml of 1 % sodium dodecyl sulphate solution pH 11 (SDS) is added by pipette and the glass beakers each held 4–5 cm deep in an ultrasound bath (SONOREX RK 102H, Bandelin, Berlin) and gently swirled back and forth so that the test objects partly float. The residual soil dissolves at a bath temperature set at 45 °C and an ultrasound treatment for 2 minutes. Wetting of the eluted test objects with acetic acid Ponceau S solution did not result in staining of residual protein. An aliquot of the resulting solution was subjected to protein quantification.

Because the detergents contain primary amines, which can lead to false results with the OPA method and rinsing with fully-demineralised water is not standardised, the modified BCA method Roti®-Quant universal (Article 0120.1, Carl Roth, Karlsruhe) with photometric measurements at 503nm was used. This has a sufficiently high sensitivity and good linearity. The determination limit lies at about 4.0 µg Protein (BSA) per ml 1 % SDS solution.

For the tests three detergents were used. Characterisation in line with manufacturers' information):

- A: mildly alkaline enzymatic detergent with tensides (pH just over 10)
- B: mildly alkaline detergent equivalent to A, however without enzymes (pH just over 10)
- C: detergent with alkali donors, enzymes and tensides (pH just over 10)

Results

To determine the recovery rate for the described soil and sample taking, first of all the amount of protein in 50 µl blood was deter-

proteínas, con una desviación estándar de 234 μg . Luego, las muestras se contaminaron con 50 μl de sangre de oveja heparinizada y reactivada, se eluyeron con ultrasonidos después de su acondicionamiento (tal y como se describe en Material y métodos) y se extrajo una porción alícuota para la determinación de proteínas. Los tres métodos independientes proporcionaron un valor medio de 8083 μg de proteínas, con una desviación estándar de 193 μg , que corresponde a una recuperación del 101%.

Se realizó un ensayo preliminar con el mismo diseño de la prueba y agua purificada pero sin aditivo detergente; las muestras se trataron a 55 °C durante 5 o 10 minutos. El contenido residual de proteína al cabo de 5 minutos fue de 396,5 μg por muestra y al cabo de 10 minutos de 390,0 μg por muestra. A los 5 minutos solo quedaba menos del 5 % de la contaminación original, situación que apenas cambió al prolongar el tiempo efectivo.

Las muestras de prueba se trataron con una concentración de 0,5 % de los detergentes A, B y C a 50, 55 y 60 °C durante 10 minutos para averiguar si se producían cambios significativos en el efecto de limpieza dentro de este intervalo de temperaturas. La norma ISO EN 15883 permite este intervalo en la fase de limpieza. En la prueba se mantuvo la temperatura de 55 °C recomendada en general por los fabricantes de LD y también por los fabricantes de la química del proceso pero se modificó la concentración del detergente: además de la concentración del 0,5 %, se analizaron las concentraciones de 0,4, 0,6 y 1,0 %. Los resultados se presentan en la Tabla 1.

Desde el punto de vista óptico, las cantidades residuales de proteína se diferenciaban bastante bien. Después de 10 minutos de tratamiento a 55 °C y con una concentración del 0,5 % de los detergentes A, B y C, las muestras se humectaron en la solución acética Ponceau S y se enjuagaron con agua purificada después de 3 minutos de exposición. El resultado se muestra en la Figura 2.

Discusión

El diseño de prueba resulta adecuado para probar el efecto de limpieza en las LD en diversas condiciones. En particular, el método para la toma de muestras con soporte ultrasónico, que permite recuperar casi el 100% de la proteína residual, es indispensable para una evaluación objetiva de la eficacia de la limpieza. Incluso si se usa agua sin detergente, el 95 % de la contaminación desaparece en muy poco tiempo; se precisa entonces una evaluación diferenciada del porcentaje residual escaso de proteína, que guarda una relación

directa con el material de la muestra.

Cuando se realiza la contaminación con plantilla, se aplican 50 μl de sangre sobre 3 cm^2 . En las directrices de DGKH, DGSV y AKI para la validación de procesos mecánicos y manuales, el criterio de aceptación para la limpieza se establece en 3 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (3, 4). Esta cifra sigue siendo inferior al límite de determinación del método BCA empleado para cuantificar la proteína, que es de aproximadamente 6,7 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ para 5 ml de la solución SDS (utilizada para la elución en esta superficie de prueba). Sin embargo, este no es el objeto de análisis en este caso concreto, ya que solo se trata de una evaluación comparativa.

Con el detergente A se alcanzan los valores residuales de proteína más bajos a temperaturas de 55 y 60 °C; para una concentración >0,5 % los residuos de proteína son inferiores al límite de determinación. El detergente B tiene la misma composición que el A, pero no se le agregan enzimas. La comparación entre los resultados de los dos detergentes muestra claramente la contribución considerable y eficiente de las enzimas. En cambio, los resultados del detergente C indican que el efecto enzimático es significativamente menor que el del detergente A (en rigor, resulta insuficiente). Solo si se aumenta de manera significativa la concentración del detergente y, por lo tanto, también la concentración de la enzima al 1 %, se obtienen resultados casi aceptables a 55 °C.

El detergente A produce resultados satisfactorios a 55 y 60 °C en una concentración de 0,5 %. Con el detergente B, los mejores resultados se obtienen a 50 y 55 °C para esta concentración y con el detergente C a 50 °C. Parece evidente que la temperatura óptima de actividad enzimática del detergente C se sitúa algo por debajo de 50 °C. Como el contenido de enzimas desempeña un papel decisivo para estos detergentes alcalinos suaves, convendría que los fabricantes de la química del proceso especificaran también el intervalo de temperaturas para una actividad óptima. Solo entonces se pueden adaptar con eficiencia los procesos para su aplicación práctica.

En el caso del detergente C, durante el ensayo a 60 °C se observaron efectos de desnaturalización térmica y fijación que no se logran compensar. Dentro del intervalo de temperaturas de 50 a 60 °C se advierten variaciones muy grandes del rendimiento. Se trata del intervalo de temperaturas permitido en la fase de limpieza según la norma ISO EN 15883-2 (margen de temperaturas de limpieza de 10 °C). En cambio, para la fase de desinfección térmica solo se especifica un margen de temperaturas de 5 °C. Las LD pueden mantener

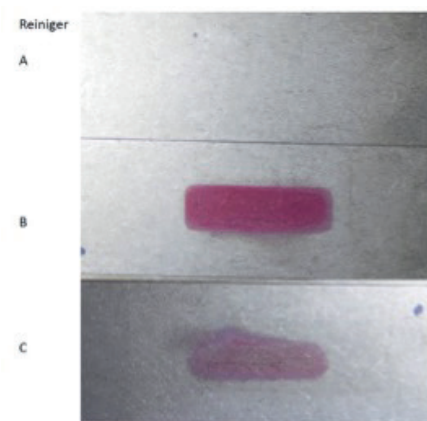


Fig. 2: Muestra coloreada con Ponceau S después de la limpieza / Test objects after cleaning stained with Ponceau S

la temperatura en la etapa de limpieza de la misma manera que en la etapa de desinfección y cabe preguntarse por qué difiere tanto la norma en este caso. Dada la enorme variación en el rendimiento con el margen de 10 °C, es imperativo que la temperatura de limpieza se mantenga dentro de un margen de $\pm 2,5$ °C. El rendimiento de los detergentes puede variar aún más con un margen térmico de 10 °C que con una variación de la concentración del 20 %. Este dato lo deben conocer los círculos especializados. ☞

Agradecimientos: deseo expresar mi agradecimiento a la empresa Dr. Schumacher GmbH, Malsfeld, por su apoyo a esta investigación.

Bibliografía / References

1. Köhnlein J et al.: Ringversuch zur Standardisierung einer praxisrelevanten Prüfanschmutzung zur vergleichenden quantitativen Bewertung der Reinigung in Anlehnung an EN ISO 15883 – Versuchsbeschreibung. – 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. Zentr Steril 2009; 17: 410–415.
2. Brill FHH et al.: Standardisiertes Verfahren zur Anschmutzung von Prüfkörpern für Reinigungsversuche. – Standardized method for application of test soil pieces in cleaning tests. Zentr Steril 2014; 22: 408 – 416.
3. Leitlinie von DGKH, DGSV und AKI für die Validierung und Routineüberwachung maschineller Reinigungs- und thermischer Desinfektionsprozesse. Zentr Steril 2017; 25 Supplement – Guideline compiled by DGKH, DGSV and AKI for the validation and routine monitoring of automated cleaning and thermal disinfection processes for medical devices. Zentr Steril 2017; 25, Supplement (5th Edition)
4. DGKH, DGSV, AKI. Leitlinie zur Validierung der manuellen Reinigung und manuellen chemischen Desinfektion von Medizinprodukten. Zentr Steril 2013; 21 Supplement - Guideline for Validation of Manual Cleaning and Manual Disinfection of Medical Devices. Zentr Steril 2013; 21, Supplement

Tabla 1: Cantidad residual de proteína en µg por muestra después de 10 minutos de tratamiento con diferentes temperaturas y concentraciones (<LD = inferior al límite de determinación)

Table 1: Residual protein in µg per test object after 10 minutes holding time at various temperatures and concentrations (< LD = less than detection limit).

Temperatura / Concentración Temperature / Concentration	50°C / 0.5%	55°C / 0.5%	60°C / 0.5%	55°C / 0.4%	55°C / 0.6%	55°C / 1.0%
Detergente A Detergent A	22.5	< LD	< LD	33.0	< LD	< LD
Detergente B Detergent B	278.5	289.0	580.0	217.0	181.0	130.0
Detergente C Detergent C	61.0	90.0	303.5	160.0	102.5	21.0

mined. Here 50 µl heparinised and reactivated sheep's blood was added to 10ml 1 % SDS solution at pH 11 and an aliquot was subjected to the determination. Three independent evaluations resulted in an average value of 8006 µg protein with a standard deviation of 234 µg. Finally the test objects were soiled with 50 µl heparinised and reactivated sheep's blood, after conditioning they were eluted according to the materials and methods described with ultrasound support and an aliquot subjected to protein determination. Three separate trials resulted in an average value of 8083 µg protein with a standard deviation of 193 µg. This corresponds to a recovery rate of 101 %.

A preliminary test with the test apparatus was carried out with fully demineralised water without the addition of detergent and test objects were treated at 55 °C with either 5 or 10 minutes holding time. The residual protein content was 396.5 µg per test object after 5 minutes and after 10 minutes holding time it was 390 µg per test object. After 5 minutes only less than 5 % of the original soil remains, and this hardly changes after the longer holding time.

Test objects were treated using the test apparatus with a concentration of 0.5 % of the detergents A, B and C at 50, 55 and 60°C each time with a holding time of 10 minutes. This shows whether there are significant differences in the cleaning effect in this temperature bandwidth, because the standard ISO EN 15883 allows this fluctuation in the cleaning phase. At the temperature of 55 °C generally recommended by manufacturers of WDs as well as those of process chemicals, the detergent concentration was varied and in addition to the concentration of 0.5 % the concentrations 0.4 %, 0.6 % and 1.0 % were tested. The results are displayed in Table 1.

The residual protein levels were also quite easily differentiated visually. To display this, after 10 minutes treatment with the test apparatus at 55 °C and 0.5% concentration of the deter-

gents A, B and C, the test objects were wetted with acetic acid Ponceau S solution and after 3 minutes holding time were rinsed with fully demineralised water. The results can be seen in Figure 2.

Discussion

The test apparatus proved itself suitable to test the cleaning effect under various conditions in the WD. In particular the type of sample taking with ultrasound support, which makes possible an almost 100 % recovery of residual protein, is indispensable for an objective evaluation of the cleaning effect. Even water without the addition of detergent removed 95 % of soil in a very short time, so it depends on a differentiated evaluation of the last few percent of residual protein, which is in direct reciprocity with the test object material.

When soiling with the template, 50 µl blood was spread over 3 cm². In the guidelines of the DGKH, DGSV and AKI for the validation of automatic as well as manual processes, an acceptance criterion of 3 µg/cm² is laid down (3, 4). That is still below the determination limit of the BCA method used here for protein quantification, which for the 5ml SDS solution used for elution for this test area lies at about 6.7 µg/cm². However that is not particularly relevant here as it is only a comparative evaluation.

The lowest residual protein values were attained with detergent A, which at temperatures of 55 and 60 °C and a concentration of ≥ 0.5 % lead to results for residual protein lower than the determination limit. Detergent B has the same composition as detergent A but without the addition of enzymes. The comparison of the results of both detergents makes clear how large and efficient the contribution of enzyme activity can be. The results for detergent C on the other hand, show that the enzyme effect compared to detergent A is considerably less and actually not sufficient. Only a considerable increase in the concentration of the detergent

and thus also the enzyme concentration to 1%, led to halfway acceptable results at 55 °C.

Detergent A gives the lowest residual protein level at 55 °C and 60 °C at a concentration of 0.5%. For detergent B the best results at this concentration are attained at 50 and 55°C and for detergent C it is at 50 °C. Evidently the temperature optimum of enzyme activity for detergent C lies possibly somewhat under 50 °C. As the enzyme composition of these mildly alkaline detergents obviously plays a determining role, it should be called for that the process chemical manufacturers should stipulate the temperature band for optimal activity. Only then can the processes in the practical situation be really efficiently adjusted.

For detergent C and the test at 60 °C the thermal denaturing and fixing effects became apparent, which are no longer compensated for. Within the temperature band 50 to 60 °C very large performance differences can be determined. This is a temperature band which according to ISO EN 15883-2 is allowed in the cleaning phase (Cleaning temperature bandwidth of 10 °C). On the other hand, for the thermal disinfection phase a temperature bandwidth of only 5 °C is stipulated. The WDs can maintain temperature in the same way in the cleaning phase as in the disinfection phase and it has to be asked why the standard differs here so much in this way. Because of the enormous difference in performance within the 10 °C band it should be urgently demanded that the cleaning temperature should be kept between +/-2.5 °C. The performance of a detergent can alter more strongly within a temperature bandwidth of 10 °C than by a change in concentration of 20 %. This fact should be taken into account in professional circles.

Acknowledgements: My thanks to Dr. Schumacher GmbH, Malsfeld for their support in the tests.