

**Schlüsselwörter**

- Reinigung
- Sterilisation
- Kontamination
- Validierung
- Instrumente

# Sind aufbereitete chirurgische Instrumente proteinfrei?

Ergebnisse der klinischen Multicenter-Restkontaminationsstudie Aufbereitung (MRSA)

Th. W. Fengler\*, H. Pahlke, S. Bisson, W. Michels

**I**n einer ersten nationalen klinischen Multicenterstudie wurde die nicht sichtbare Restkontamination (Blut, Proteine) auf verschiedenen chirurgischen Instrumenten nach der Reinigung untersucht. Es handelte sich um eine prospektive Beobachtungsstudie zur Erfassung des derzeitigen Ist-Zustandes. Es zeigte sich, dass mit 2 semi-quantitativen und einer quantitativen Analyse am Eluat bei vielen Proben Protein- oder Blutreste nachweisbar waren. Hieraus lässt sich noch keine Aussage hinsichtlich einer Patientengefährdung ableiten. Es ist aber ein Hinweis auf die Notwendigkeit der Entwicklung einer Methode, den Reinigungserfolg bewertbar zu machen, um so die Verfahrensvalidierung der Sterilgut-Aufbereitung in allen Schritten sicherstellen zu können.

## Einleitung

Wie frei von möglicherweise Patientengefährdenden Protein-Anhaftungen (-Kontaminationen) sind beliebige, als sauber erscheinende chirurgische Instrumente nach der Reinigung, der letzten Dekontaminationsmaßnahme vor der abschließenden Sterilisation? Hierzu gibt es bisher nur wenige klinische Untersuchungen, wie eine Literaturrecherche belegt (1, 2, 3, 4, 6, 9, 13, 14, 16, 17, 18, 19).

Die Qualitätskontrolle und Überprüfung der Reinigung erfolgt bis heute in der klinischen Routine ausschließlich visuell(-taktile). Das Medizinproduktegesetz (MPG) fordert eine Dokumentation der Aufbereitung von Medizinprodukten

(„validiertes Verfahren“) (10). Bisher beschränkte diese sich vornehmlich auf den Nachweis der Einhaltung der Bedingungen des Sterilisationsprozesses, dem allerletzten Schritt der Aufbereitung. Alle Schritte, von der Ablage der kontaminierten Instrumente bis hin zur Verpackung und abschließenden Sterilisation müssen aber bewertet und nachvollziehbar (zum Erfolg führend) durchgeführt und dokumentiert werden können.

Die Reinigungsleistung und die instrumentenspezifische Umsetzung bei maschinellen Verfahren muss daher bewertbar sein. Bisher ist noch recht unklar, mit welcher Bewertungsmethode in Zukunft in der klinischen Routine gearbeitet werden kann, welche Analysemethoden Akzeptanz finden werden.

Eine Norm mit allgemeinen Leistungsanforderungen ist als prEN ISO 15883-1 in Bearbeitung (12). Für die Bewertung der Reinigungsleistung wurde entsprechend der britischen Vorlage davon ausgegangen, dass alle vom Patienten abstammende und durch Reinigung zu entfernende Kontamination in irgendeiner Weise proteinhaltiger Natur ist. Daher wird neben der visuellen Kontrolle der Reinigung eine proteinanalytische Bewertung bzw. Messung als die Methode der Wahl angesehen.

Eine Prüfung der Reinigung mit der bisher üblichen, in Deutschland praktizierten Methode der Bioindikatoren gäbe über die Reinigungsleistung keine korrekte Auskunft, denn es kann nicht quantitativ zwischen Ausmaß der Keimreduktion durch Abschwemmung wie auch Ausspülung und Abtötung nach Exposition im Gesamtverfahren unterschieden werden (15).

In der industriellen Produktion werden, wenn nicht zu 100% Kontrollen, so doch Stichprobenkontrollen durchgeführt. Inzwischen können auch in der „Produktionsabteilung“ Zentralsterilisation derartige Kontrollen zur objektiven Bewertung der Reinigbarkeit der Instrumente vorgenommen werden – und eine sukzessive Schwachstellen-Analyse. (Qualitätskontrolle, höheres Sicherheitsniveau für die Sterilisation und die Wiederverwendung der Instrumente am Patienten).

Zur Wirksamkeitsprüfung eines Reinigungsverfahrens muss eine Prüfanschmutzung gewählt werden, welche die am schwierigsten zu entfernende, dennoch praxisrelevante auftretende Anschmutzung nachahmt. Im Rahmen der Validierung von Reinigungsverfahren soll der Nachweis erbracht werden, dass diese mit einem hohen Grad an Sicherheit bei der Instrumentenaufbereitung (in der Praxis) beständig ein Produkt erzeugt, das die vorher definierten Spezifikationen und Qualitätsmerkmale (hier in Bezug auf den Grad der Proteinfreiheit) erfüllt. Ob die verschiedenen Bestandteile der Prüfanschmutzungen dazu beitragen, ist zunächst in Frage zu stellen und muss durch Validie-

\* Dr. med. Dipl.-Ing. Th. W. Fengler, Chirurgie-Instrumenten-Arbeitsgruppe (CIA) am Krankenhaus Moabit, Kranoldstr. 24, D-12051 Berlin

H. Pahlke, CIA Berlin

Dipl.-Soz. S. Bisson, Biometrie, Robert Koch-Institut (RKI) Berlin

Dr. rer. nat. Dipl.-Chem. W. Michels, Miele & Cie, Anwendungstechnik, Gütersloh

zung der Prüf- und Messmethode nachgewiesen werden. Blutkontaminationen haben sicher hohe Praxisrelevanz, aber neben Blut sind weitere wichtige wie Schleim und Fette zu nennen, die in jedem beliebigen Verhältnis vermischt auftreten können und pathogene Substanzen und Organismen umhüllen und diese damit vor Desinfektions- oder Sterilisationsmaßnahmen zu schützen vermögen.

Die Verwendung von Prüfkörpern sieht obengenannte Norm derzeit nicht vor. Spülraumwand, Elemente der Einsätze bzw. Körbe und eine Auswahl der üblichen Instrumente, für die das Verfahren vorgesehen ist, müssen demnach angeschmutzt werden. Prüfkörper können auch nicht die vielen verschiedenen konstruktiven Merkmale der Instrumente in ihrer spültechnischen Relevanz nachstellen. Qualitative und halbquantitative Methoden müssen anhand quantitativer bewertet werden. Alle Testanschmutzungen müssen aber einen Bezug zur klinischen Wirklichkeit aufweisen.

Vor diesem Hintergrund ist es das Ziel dieser Studie, in Phase I zunächst eine Ist-Analyse der Proteinkontamination vorzunehmen sowie Probleme bei Studiendesign und -ablauf zu erfassen. Basierend auf deren Ergebnissen und Erfahrungen können die weiteren Phasen geplant und durchgeführt werden. Am Ende der Messreihen aller noch festzulegender Phasen sollte die Definition eines Grenzwertes „Sauberkeit“ für die verschiedenen Methoden der Beurteilung von Reinigung möglich sein.

## Material und Methoden

Diese klinische Beobachtungsstudie (Ist-Erfassung) wurde in 5 Zentren für Sterilgutaufbereitung durchgeführt. (Eines der Zentren verlagerte während der Studie den Standort; in den nachfolgenden Graphiken werden entsprechend 6 Zentren aufgeführt.) Untersucht wurden 6 verschiedene Instrumententypen (Spekulum, Grobe Klemme Wertheim, Trokarhülse, Trokarklappenventil, Funktionsteil der scharfen Fasszange (MIC), Knochenfeile – 8 Proben pro Instrumententyp) unter Berücksichtigung der Prozessparameter.

Hierzu gehörte die Vorreinigung mit Ultraschall, das verwendete Reinigungs-Desinfektionsmittel (mit/ohne Neutralisator), der Typ des Reinigungs-Desinfektions-Trocknungsautomaten (RDTA), das Programm. Entscheidend für die Ergebnisse der Elutionsmethoden ist, inwieweit die Probe-Lösung Partikel enthält (idealerweise keine Partikel). Nur solche Instrumenten-Proben (Eluat) wurden einbezogen, die visuell keine Verunreinigung aufwiesen.

Von der Chirurgie-Instrumenten-Arbeitsgruppe (CIA) am Krankenhaus Moabit Berlin wurde für jeden Instrumententyp (n = 8) ein Instrumentenbegleitschein für die Dokumentation dieser Parameter erstellt und ausgewertet. Jedes Eluat sollte damit eindeutig beschrieben sein.

Die visuelle Bewertung, Hämoglobin-Test und modifizierte Biuret-Methode wurden im jeweiligen Zentrum direkt durchgeführt. Die OPA-Methode wurde in der Abteilung Bioverfahrenstechnik der Fachhochschule Hannover (Prof. Dr. H. Frister) und bei Miele in Gütersloh (Dr. W. Michels) durchgeführt. Dazu wurde 1 ml des Eluats eingefroren und kodiert versandt.

Drei verschiedene, zur Verfügung stehende Methoden der Beurteilung von Reinigung nach SDS-Elution der chirurgischen Instrumente sollten hinsichtlich ihrer Praktikabilität und der Vergleichbarkeit ihrer Ergebnisse miteinander verglichen werden (11):

- Hämoglobin-Test
- Modifizierte Biuret-Methode
- Modifizierte OPA-Methode

*Anmerkung: Die Erprobung der qualitativen Ninhydrin-Methode war nicht möglich, da die Tupfer eine Eigenreaktion aufwiesen. Sie wird in der Chemie bei der Papierchromatographie zum Nachweis kleinster Aminosäure-Mengen verwendet. Ninhydrin ist eine Triketo-Verbindung und kondensiert mit der Aminogruppe einer Aminosäure unter Kohlendioxidabspaltung zu einem purpurroten bis rotblauen Farbstoff komplizierter Konstitution. Die Verfärbung ist bei allen Aminosäuren eindeutig bis auf das cyclische Prolin, bei dem eine gelbe Färbung resultiert. Die Spezifität des Nachweises, die Empfindlichkeit und die eindeutige Färbung sind bei (nicht hydrolysierten) Proteinen nicht gegeben. Die Farbreaktion ist pH- und proteinabhängig. Es resultiert oft nur eine unspezifische gelbliche oder bräunliche Verfärbung, deren Beurteilung zu falsch negativen Ergebnissen führen kann [Michels].*

*Im „Health Technical Memorandum“ (HTM) 2030 des britischen National Health Service (NHS) ist die Ninhydrin-Methode ebenfalls aufgeführt und empfohlen. Es wird dort sogar auf eine Literaturstelle (Analytical Biochemistry 1993; 211: 240–241) verwiesen. Diese bezieht sich jedoch auf die quantitative Bestimmung von Chitosan und den Anteil freier Aminogruppen in Chitosanproben. Hierbei geht es um Glucosamine und nicht um Proteine; es hat also mit der hier behandelten Problematik nichts zu tun. Es fehlen Untersuchungen zur Anwendung der Methode mit den unterschiedlichen Prüfanschmutzungen.*

## Hämoglobin-Test

Hierbei handelt es sich um ein bewährtes kolorimetrisches In vitro-Diagnostikum (Sangur-Test, Fa. Boehringer, Mannheim), das normalerweise in der Urindiagnostik verwendet wird. Auf einem Teststreifen erfolgt die Pseudoperoxidase-Reaktion bei Anwesenheit von hämolysierten Erythrozyten. Nach Eintauchen ins Eluat und Abstreifen von Flüssigkeit tritt die Verfärbung in Abhängigkeit vom Hämolysegrad auf. Abgelesen wird entweder an der Erythrozyten-Tafel oder an der Tafel für hämolysierte Erythrozyten (homogenes Farbfeld) im Bereich von 10 – 250 Erys/ $\mu$ l.

## Modifizierte Biuret-Methode

Anlässlich des Forums 2000 auf der MEDICA wurde ein neu entwickeltes Test-Kit vorgestellt (Fa. Miele, Gütersloh). Die kolorimetrische Proteinmessung im Eluat erfolgt halbquantitativ mit der in Biologie und Biochemie oft verwendeten Biuret-Reaktion. Diese ist jedoch modifiziert, so dass eine gute Lagerstabilität der Reagenzien und keine Störeinflüsse durch die Spülmittellösung (SDS-Elution) gegeben sind.

Diese Modifizierung verändert die Reaktion mit Protein auch hinsichtlich des Farbumschlags gegenüber der bekannten Biuret-Reaktion: Proteine (Verbindungen mit mindestens zwei Peptidbindungen) geben mit  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen in alkalischer Lösung einen violetten Komplex. Bei diesem modifizierten Test-Kit ist in den Gefäßen eine  $\text{Cu}^{2+}$ -Lösung vorgelegt, der nach Zugabe der Probelösung (SDS-Eluat) den Kupfer(II)-Protein-Komplex bildet. Mit dem Reagenz 2 wird dann das überschüssige  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^+$  reduziert, welches mit Reagenz 3 einen rotvioletten Komplex bildet (Konzentration

umgekehrt proportional zur Proteinkonzentration).

Zur Kontrolle des Reinigungserfolges bei einem Instrument wird die Fläche (innen und/oder außen) mit einer möglichst geringen Menge (5 ml) einer Spülmittellösung (1% SDS = Natriumdocylsulfat) wiederholt abgespült, wobei der größte Teil gegebenenfalls vorhandener Proteine in Lösung geht. Ein Milliliter der Lösung wird in eines der Gefäße gegeben, in dem eine Reaktionslösung vorliegt. Nach 5 Minuten wird mit einem Mikrolöffel ein pulverförmiges Reagenz und ein Tropfen Reagenzlösung zugegeben. Eine dann erhaltene rot-violette Färbung bestätigt die Proteinfreiheit der abgespülten Oberfläche, eine geringere Färbung bis hin zur farblosen Lösung indiziert steigenden Proteingehalt. Bei mehr als 90 µg Äquivalent Rinderserumalbumin ist die Lösung farblos als deutlicher Hinweis auf Proteinkontamination (Vierfeldertafel).

### Modifizierte OPA-Methode

Bei dieser seit Jahrzehnten in der Milch-verarbeitenden Industrie eingesetzten Methode werden mit hoher Sensitivität und Spezifität die  $\alpha$ - und  $\epsilon$ -terminalen Aminogruppen der Proteine erfasst (7, 11). Diese setzen sich in einer stöchiometrischen Reaktion mit dem Reagenz o-Phthal-di-aldehyd in Gegenwart einer Thiolkomponente unter definierten Bedingungen zu photometrisch bei 340 nm detektierbaren Iso-Indolen um. Wichtig bei der Durchführung ist die Kenntnis chemischer Einflüsse und der photometrischen Messmethode.

Die Probengewinnung erfolgt ebenfalls durch Abspülen (Elution) der gesamten Instrumentenoberfläche (innen und/oder außen) mit möglichst geringen Volumina (5 ml 1% SDS), um unnötige Verdünnungseffekte für die nachfolgende Proteinbestimmung zu vermeiden. Aufgrund seiner denaturierenden Wirkung ist SDS ein stark Protein-entfaltendes und -lösendes Detergenz. Es findet daher in der Proteinanalytik häufig Verwendung.

Diese Art der Probengewinnung schließt allerdings andere Analysemethoden wie Bradford, Lowry, Eosin und je nach chemischer Abstammung

des Reagensatzes auch die Biuret-Methode aus (SDS-geeignete Test-Kits zur halbquantitativen Bestimmung existieren zur letztgenannten Methode bzw. sind in Entwicklung. Ihr Einsatz ist jedoch bei der quantitativen Bestimmung nicht sinnvoll, da Saccharose, welches im Schleim vorhanden ist, eine Störsubstanz bei der Biuret-Reaktion darstellt).

Je nach Art der chemischen Reaktion haben alle Methoden Störfaktoren, welche die Erfassung möglicherweise vorhandener Proteine beeinträchtigen können; dies gilt auch für Isotopen-Methoden (8, 16). Insbesondere trifft das auf Aldehyde (z.B. Desinfektionsmittelreste) zu, welche die zu erfassenden Aminogruppen chemisch maskieren können (5). Weiterhin ist festzustellen, dass bei den Methoden, die auf der Bildung von Koordinationskomplexen basieren, je nach Art des Proteins und seinem Denaturierungszustand unterschiedliche Protein-Bindungskonstanten auftreten, die zu nicht reproduzierbaren Untersuchungsergebnissen führen. Wir gehen jedoch bei der maschinellen Aufbereitung chirurgischer Instrumente von Trockenentsorgung aus, da eine Vorbehandlung mit Aldehyden grundsätzlich zu Reinigungsproblemen durch Fixierung führen würde.

Die quantitative Bestimmung von visuell-sichtbaren Kontaminationen ist nicht sinnvoll. Von besonderer Bedeutung bei der Probengewinnung ist eine angemessen hohe Wiederfindung möglicher vorhandener Proteine. Je nach Instrumentenart ist die Elutionsmethode zu modifizieren und zu kontrollieren. Besonders zu beachten ist, dass der Lösungsprozess zeitabhängig ist. Von Bedeutung ist eine hohe Wiederfindung in erster Linie im Grenzbereich der zu definierenden Reinheit, was durch die SDS-Elutionsmethode erreichbar ist. Je geringer die Schichtdicke der Blutanschmutzung ist, um so geringer ist die Fibrinquervernetzung und Kontraktion des Blutkuchens und um so besser gehen die Proteine in Lösung, so dass eine hohe Wiederfindung erreichbar ist. Eine Verbesserung der Lösung von Blutinkrustation ist durch Alkalisierung der SDS-Lösung auf pH = 11 zu erzielen. Es ist allerdings sicherzustellen,

dass dieses die Reaktionsbedingungen der OPA-Methode nicht verändert.

Die OPA-Messung ist als Labormethode von geschultem Personal durchzuführen. Besonders ist darauf zu achten, dass das zu vermessende Probevolumen je OPA-Ansatz exakt gleich ist, gut durchmischt wurde und keine Trübungen oder Partikel aufweist. Das OPA-Reagenz ist täglich frisch herzustellen und die Messung in geprüften, sauberen und trockenen Quarzküvetten durchzuführen. Weiterhin muss der Blindwert sowie die Eigenextinktion der zu untersuchenden Probe berücksichtigt werden. Die Messwert-Ablesung hat erst bei Extinktionskonstanz zu erfolgen. Da die modifizierte OPA-Methode hochempfindlich ist, sind vorzugsweise Doppelbestimmungen auszuführen und bei sehr niedrigen Extinktionen ist gegebenenfalls durch doppelte Zugabe der Probemenge zu prüfen, ob es sich überhaupt um eine OPA-Sensitivität handelt (entsprechender Anstieg der Extinktion/Lambert-Beersches Gesetz).

Das Thema „Reinigung“ stellt ganz neue Ansprüche an die Labormethoden und die Methodvalidierung gegenüber den bisherigen mikrobiologischen Untersuchungen zur Desinfektionsleistung und erfordert andere chemische und analysetechnische Kenntnisse.

## Ergebnisse

*Vorbemerkung: Eine detaillierte Darstellung der statistischen Auswertung (deskriptive Datenanalyse) ist im Referateband des Forum 2000 „Instrumenten-Aufbereitung – Prüfung maschineller Reinigungsleistung“ (auf der MEDICA in Düsseldorf, 24.11.2000) enthalten. Dort finden sich auch die Anschriften der Mitglieder der Interessengruppe Reinigung bei der (maschinellen Aufbereitung (IRA).*

### Beschreibung des Datensatzes

48 Proben pro Zentrum wurden untersucht, 240 Proben insgesamt (8 Proben von je 6 Instrumententypen). Ausgewertet wurden 219 Proben, von denen 202 (92%) visuell-taktil als „sauber“, 14 Proben (6%) als „verunreinigt“ klassifiziert wurden (3 Proben Beurteilung nicht dokumentiert).

Die Erkennbarkeit von Partikeln war nicht immer eindeutig auf dem Instrumentenbegleitschein dokumentiert.

179 Proben (82%) waren eindeutig dokumentiert, bei 40 Proben (18%) war die Angabe nicht eindeutig interpretierbar oder fehlte vollständig. 159 Probe-Lösungen (89%) waren frei von Partikeln, in 20 Probe-Lösungen (11%) waren Partikel erkennbar.

Die Ergebnisse des Hämoglobin-Tests von insgesamt 176 Probelösungen (80%) ergeben für 43 Probe-Lösungen (20%) keine Angaben (bzw. vorliegende Angaben nicht interpretierbar). Von den 176 interpretierbaren Probe-Lösungen wurden 153 (87%) als negativ (Wert „0 Erythrozyten“) bewertet, 23 Probe-Lösungen (13%) wurden als positiv gewertet: In 4 Fällen (2,3%) lautete die Angabe „5 – 10 Erythrozyten“, jeweils 6 Lösungen (3,4%) wurden mit „< 10 Erythrozyten“ bzw. „50 Erythrozyten“ bewertet und 7 Proben (4%) wurden mit „250 Erythrozyten“ klassifiziert. Nach dem Hämoglobin-Test war also mit 87% (153 Proben) die große Mehrheit der beurteilten Probe-Lösungen nach Reinigung „sauber“.

Mit der modifizierten Biuret-Methode) enthielten 197 (90%) der 219 Probe-Lösungen interpretierbare Angaben, bei 22 Proben (10%) waren keine Angaben vorhanden. Lediglich 64 Proben (33%) wurden als negativ bewertet, 15 Proben (7,6%) wurden mit der Angabe „0 – 30“ beschrieben, 58 Proben (29%) wurden mit „30“ bewertet, 6,6% (13 Proben) erhielten die Bewertung „30 – 60“, 35 Proben (17,8%) wurden mit dem Wert „60“ klassifiziert und 12 Proben (6,1%) erhielten mit „90“ den Höchstwert zugeteilt. Lediglich 32,5% der Probelösungen (64 Proben) wurden demnach als „sauber“ beurteilt; 67,5% der Probe-Lösungen (133 Proben) wurden als „proteinhaltig“ klassifiziert.

Die Ergebnisse der modifizierten OPA-Methode waren für 210 der 219 Probelösungen (96%) beurteilbar. Zur vereinfachten Darstellung wurden die Ergebnisse in zwei Klassen zusammengefasst: Werte < 0,01 (Nachweisgrenze) gelten als „sauber“, Werte > 0,01 gelten als Indiz für Proteine. Nach dieser Einteilung sind nach der OPA-Methode 95 Probelösungen (45%) als „sauber“, 115 Proben (55%) als „aminhaltig“ zu beurteilen, d.h. sie enthalten OPA-sensitive primäre Aminogruppen.

Der Reinigungserfolg könnte u.a. dadurch beeinflusst werden, ob eine Vorreinigung mit Ultraschall durchgeführt wurde oder nicht. Hierzu liegen Angaben für 211 (96%) der 219 Probelösungen vor. Bei 106 Proben (50,2%) wurde Ultraschall eingesetzt, in den restlichen 105 Fällen (49,8%) wurde keine Vorreinigung mit Ultraschall durchgeführt.

#### Analyse-Methoden-Vergleich

Vergleicht man die Ergebnisse der drei diagnostischen Methoden, so kann dieser nur an Spüllösungen (Eluaten) vorgenommen werden, bei denen tatsächlich alle Tests durchgeführt wurden (Hämoglobin-Test, modifizierte Biuret-Methode, modifizierte OPA-Methode). 150 (68,5%) der 219 Probe-Lösungen erfüllen obengenannte Kriterien: Keine visuell-taktile Verunreinigung erkennbar, sowie Ergebnisse aus Hämoglobin-Test, Biuret-Methode und OPA-Methode interpretierbar.

Für 138 (92%) der 150 Probe-Lösungen waren Angaben zur Erkennbarkeit von Partikeln in der Lösung vorhanden. In zwölf Lösungen (8,7%) waren Partikel erkennbar, die restlichen 126 Probe-Lösungen (91,3%) waren frei von Partikeln. Bei 59 Instrumenten (39,3%) wurde eine Vorreinigung mit Ultraschall durchgeführt, bei 91 Instrumenten (60,7%) fand keine Vorreinigung mit Ultraschall statt.

Im Hämoglobin-Test für die 150 Probe-Lösungen (die die Analyse-Kriterien erfüllen) wurde mit 90,7% (n = 136) die Mehrzahl der Probe-Lösungen als „sauber“ klassifiziert („0 Erythrozyten“ bzw. negativ), 9,3% bzw. 14 Probe-Lösungen wurden als verunreinigt beurteilt: 3 Eluate (2%) „250 Erythrozyten“, 3 Eluate (2%) „50 Erythrozyten“, 5 Eluate (3,3%) „< 10 Erythrozyten“, 3 Eluate (2%) „5 – 10 Erythrozyten“.

In der modifizierten Biuret-Methode wurden 52 (34,7%) der 150 Proben als negativ klassifiziert, 15 Proben (10%) erhalten die Beurteilung „0 – 30“, 56 Proben (37,7%) erhalten den Wert „30“, 12 Probe-Lösungen (8%) werden als „30 – 60“ bewertet, 13 Proben (8,7%) als „60“ und 2 Probe-Lösungen (1,3%) erhalten mit „90“ die schlechteste Bewertung der modifizierten Biuret-Methode. Nach der modifi-

zierten Biuret-Methode werden also 52 Proben (34,7%) als „sauber“, 98 Proben (65,3%) als „verunreinigt“ klassifiziert.

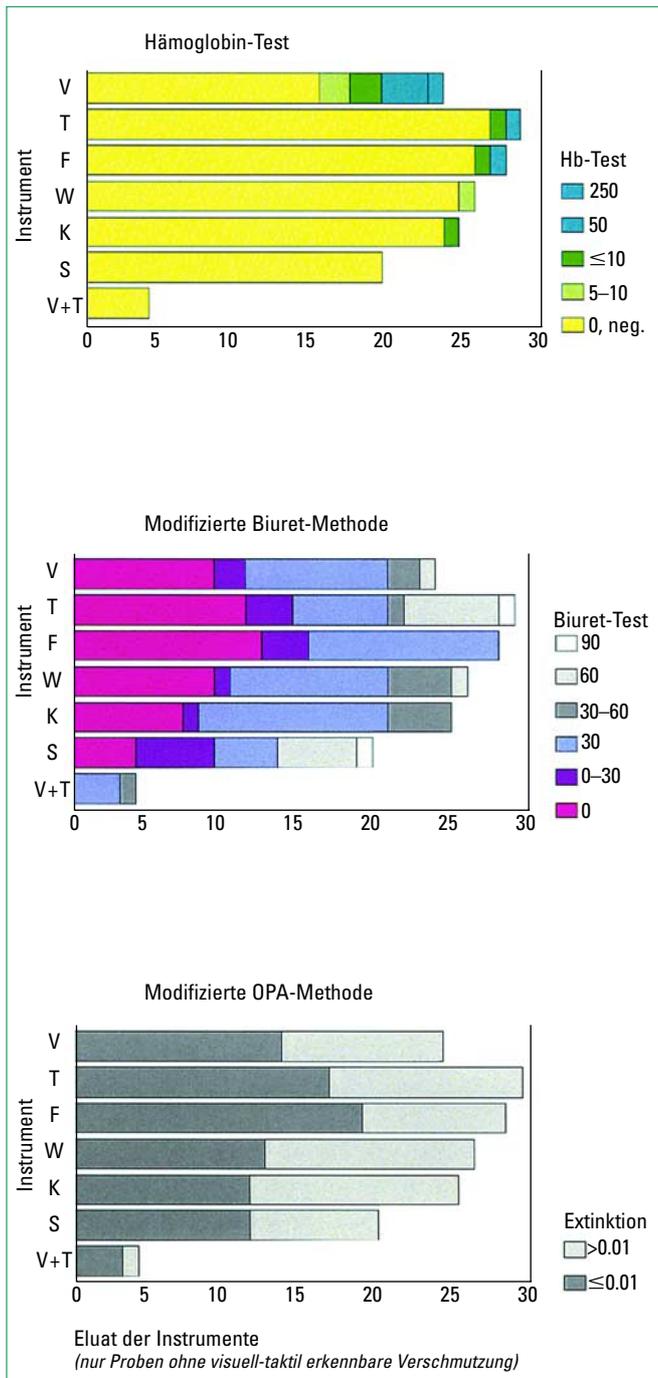
In der modifizierten OPA-Methode wurden 53 Proben (35%) als „sauber“ beurteilt, 97 Proben (65%) nach den vorgegebenen Kriterien als „verunreinigt“ klassifiziert.

Die drei Methoden kommen dabei zu unterschiedlichen Urteilen. Die Ergebnisse der modifizierten OPA-Methode und der modifizierten Biuret-Methode ähneln sich hinsichtlich der groben Klassifizierung in „sauber“ (OPA- und Biuret-Methode jeweils 35%) und „verunreinigt“ (ca. 65%) relativ stark, der Hämoglobin-Test kommt mit der Beurteilung von 91% der Proben als „sauber“ und 9% der Proben als „verunreinigt“ zu einer wesentlich anderen Einschätzung. Allerdings bedeutet diese Aussage nicht, dass OPA-Methode und Biuret-Methode dieselben Proben als „sauber“ bzw. „nicht sauber“ beurteilen.

#### Statistische Bewertung der Methoden-Übereinstimmung

Nun soll geprüft werden, inwieweit die drei Methoden die jeweils selben Probelösungen hinsichtlich ihrer „Sauberkeit“ übereinstimmend beurteilen. Für einen solchen Vergleich ist es bei qualitativen bzw. semiquantitativen Methoden erforderlich, dass alle Methoden die gleiche Anzahl an Kategorien benutzen. Daher wurden die Ergebnisse der modifizierten Biuret-Methode und des Hämoglobin-Tests in jeweils drei Kategorien zusammengefasst. Für die OPA-Methode wurden Ergebnisse oberhalb der Nachweisgrenze (> 0,01) aus statistisch-methodischen Gründen in zwei Kategorien zusammengefasst.

Diese neu definierten ordinalen Variablen bieten die Möglichkeit, die drei Methoden hinsichtlich des Zusammenhangs ihrer Ergebnisse statistisch zu analysieren. Als Signifikanzniveau für die Verallgemeinerung der Ergebnisse der statistischen Tests wird eine Irrtumswahrscheinlichkeit  $p < 0,05$  festgelegt. Mit dem Konkordanzmaß W nach Kendall wurde zunächst geprüft, inwieweit die Ergebnisse aller drei Methoden übereinstimmen. Kendalls W ist ein Koeffizient zur Prüfung der Güte der Übereinstimmung zwischen mehreren



**Abb. 1** Ergebnisse der drei Methoden bei den Instrumententypen (n = 150)  
 V = Trokarklappenventil, T = Trokarhülse, F = Funktionsteil der scharfen Fasszange (MIC), W = Grobe Klemme Wertheim, K = Knochenfeile, S = Spekulum  
 V + T: in einem Zentrum wurden Trokarhülse und -klappenventil gemeinsam bewertet

abhängigen ordinalen Variablen, der Werte im Bereich von 0 bis 1 annehmen kann. Der Wert 1 indiziert eine perfekte, der Wert 0 keine Übereinstimmung. Ab einem Wert von 0,6 kann die Übereinstimmung als gut gewertet werden. Mit einem Wert von 0,35 ( $p < 0,001$ ) ist die Übereinstimmung zwischen den 3 Methoden als mäßig positiv einzuschätzen.

Im nächsten Schritt wurden jeweils 2 Methoden in Form von Kontingenztabelle gegenübergestellt und das Übereinstimmungsmaß Kappa sowie als Zusammenhangsmaß Ken-

dalls Tau-b berechnet. Kappa ist ein Maß zur Beurteilung der Güte der Übereinstimmung zweier qualitativer Variablen. Der Kappa-Wert variiert von 0 bis 1, wobei der Wert 0 keine Übereinstimmung und der Wert 1 vollständige Übereinstimmung indiziert. Ab einem Kappa-Wert von 0,6 kann von einer guten Übereinstimmung gesprochen werden. Mit Kappa-Werten unterhalb 0,1 sind die Übereinstimmungen der Ergebnisse der Methoden bei den vorliegenden Daten sehr schlecht.

Der Zusammenhang zwischen zwei jeweils ordinalen Variablen kann mit dem Koeffizienten Tau-b nach Kendall statistisch geprüft werden; dieses Maß eignet sich, wenn – wie hier – viele sog. „Ties“ (gleiche Werteausprägungen) vorkommen. Tau-b kann Werte im Bereich von -1 bis +1 annehmen. 0 indiziert keinen Zusammenhang zwischen den geprüften Variablen, der Betrag 1 steht für einen perfekten Zusammenhang. Ein negatives Vorzeichen bedeutet, dass niedrige Werte der einen Variablen mit hohen Werten der anderen Variablen einhergehen. Positiv bedeutet, dass hohe Werte bei einer Variablen mit hohen Werten bei der anderen Variablen zusammen auftreten, und entsprechend auch niedrige Werte mit niedrigen gepaart sind. Ab einem Betrag von 0,6 kann man von einem mäßig starken Zusammenhang zwischen zwei Variablen sprechen.

Von einem Zusammenhang zwischen den Ergebnissen der drei Methoden kann – statistisch betrachtet – nicht gesprochen werden ( $< 0,25$ ). Als Ergebnis kann man festhalten, dass der Hämoglobin-Test mit der höchsten Anzahl an negativen Werten am stärksten aus dem Rahmen fällt. Die modifizierte OPA-Methode und die Biuret-Methode ähneln sich in der Zahl der positiven bzw. negativen Befunde, die jedoch oft nicht korrelieren.

Die drei Methoden detektieren unterschiedliche Bestandteile bzw. chemische Strukturen der von Instrumenten eluierten Rückstände. Besonders bei geringer Restkontamination, bei der eine klinische Bedeutung überhaupt in Frage steht, sind daher auch in höherem Maße Ergebnisunterschiede zu erwarten. Hinzu kommt vermutlich auch des öfteren eine Fehlbewertung des geringen Farbunterschiedes (subjektiv-visuell) bei der Biuret-Methode im Grenzbereich negativ – schwach positiv.

#### Statistische Bewertung des Einflusses der Instrumentenform (Design)

Mit Ausnahme des Trokarklappenventils wurden bei allen Instrumenten mehr als 90% der Probe-Lösungen ausschließlich im Hämoglobin-Test als „sauber“ beurteilt. Beim Trokarklappenventil erhalten lediglich 66% der Probelösungen das Urteil „sauber“, in 4 Probe-Lösungen (17%) werden 50 bzw. 250 Erythrozyten diagnostiziert.

Als „sauber“ beurteilt werden jeweils etwa 36% bis 44% der Probe-Lösungen des Trokarklappenventils, der Trokarhülse, des Funktionsteils der scharfen Fasszange und der Groben Klemme (Wertheim). 29% der Probe-Lösungen werden bei der Knochenfeile als „sauber“ beurteilt und 21% beim Spekulum. Schließlich erhält keine der vier Probe-Lösungen der Kombination Trokarhülse und Trokarklappenventil das Prädikat „sauber“.

Trokarklappenventil und -hülse erhalten ähnliche Urteile: Jeweils circa 30% der Probe-Lösungen werden als „sauber“ bewertet. Beim Spekulum werden 37% der Probe-Lösungen als „sauber“ klassifiziert, bei der Groben Klemme (Wertheim) sind es 40% und beim Funktionsteil der scharfen Fasszange 52%. Lediglich 25% der Probe-Lösungen werden dagegen bei der Knochenfeile als „sauber“ beurteilt, bei der Kombination Trokardhülse und Trokarklappenventil erhält keine der vier Proben das Urteil „sauber“. Weitergehende Analysen zu Zusammenhang und der Übereinstimmung der Ergebnisse der drei Beurteilungsmethoden auf der Ebene der Instrumententypen sind aufgrund der kleinen Fallzahlen nicht sinnvoll.

Abbildung 1 zeigt die Beurteilungen der drei Methoden für die 6 Instrumententypen, Abbildung 2 zeigt die Ergebnisse nach Zentren gegliedert. Die Abbildungen beziehen sich auf die 150 Probe-Lösungen, die visuell-taktil als „sauber“ beurteilt wurden und für welche die Ergebnisse aller drei diagnostischen Methoden vorlagen.

### Diskussion

Die Phase 1 der Multicenter-Restkontaminationsstudie Aufbereitung (MRSA) untersuchte verschiedene typischerweise in chirurgischen Fachdisziplinen verwendete Instrumententypen mit unterschiedlicher klinisch verursachter Ausgangsverunreinigung. Es sollte hierbei eine Ist-Erfassung vorgenommen und gemessen werden, was bisher nicht gemessen wurde: Wieviel und welches „Material“ lässt sich von einem als visuell-taktil „sauber“ eingestuften Instrument in der Zentralen Sterilgutaufbereitungsabteilung unter klinischen Bedingungen abspülen?

Dazu wurden drei Methoden der Reinigungsbeurteilung eingesetzt. Jede Methode bezieht sich auf einen anderen relevanten Bestandteil klinischer Restkontamination: Hämoglobin (Sangur-Test), Protein (modifizierte Biuret-Methode), Amin (OPA-Methode). Von den durchgeführten 219 Elutionen konnten 150 verwertet werden, bei denen Ergebnisse aller drei Testmethoden vorlagen und die visuell-taktil als „nicht verunreinigt“ beurteilt worden waren, d.h. nur „saubere“ Instrumente müssen mit aufwendigen Methoden auf potentielle nicht sicht- und fühlbare Verunreinigungen getestet werden. Entsprechend beschränkte sich die vergleichende Auswertung auf diejenigen Proben, die nach visuell(-taktile) Kontrolle als „nicht verunreinigt“ klassifiziert wurden (Einschlusskriterium). Nicht in Betracht gezogen wurde,

- ob Partikel in der Probelösung erkennbar waren
- ob eine Vorreinigung mit Ultraschall durchgeführt wurde
- dass unterschiedliche Reinigungsmaschinen mit unterschiedlichen Programmen und unterschiedlichen Reinigungsmitteln zum Einsatz kamen.

Diese Parameter können die Ergebnisse der Tests aber mehr oder weniger stark beeinflussen. Um diese Punkte systematisch bei der Auswertung zu berücksichtigen, müsste allerdings eine wesentlich größere Anzahl an Proben vorliegen.

Je nach Instrument und Design gab es auch nicht-flüssige Bestandteile (Partikel), die mit diesen Methoden nicht bewertet

werden können. Allerdings fehlten zu diesem Aspekt oftmals Angaben; berücksichtigt werden muss auch, dass im klinischen Alltag Partikel in der Lösung eventuell gar nicht entdeckt werden oder im Instrument hängen bleiben. Für die Auswertung der Daten von Phase 1 wurden Angaben zu Partikeln daher nicht berücksichtigt. Systematisch kann der Einfluss vorhandener sichtbarer oder unsichtbarer Partikel auf die Ergebnisse der drei Verfahren nur in Laborversuchen analysiert werden.

Folgende Punkte erschweren die Interpretation der Daten aus statistisch-methodischer Sicht:

- Instrumentenbegleitschein sowie Ausfüllanweisungen stellten sich für eine einheitliche Beurteilung der Daten als

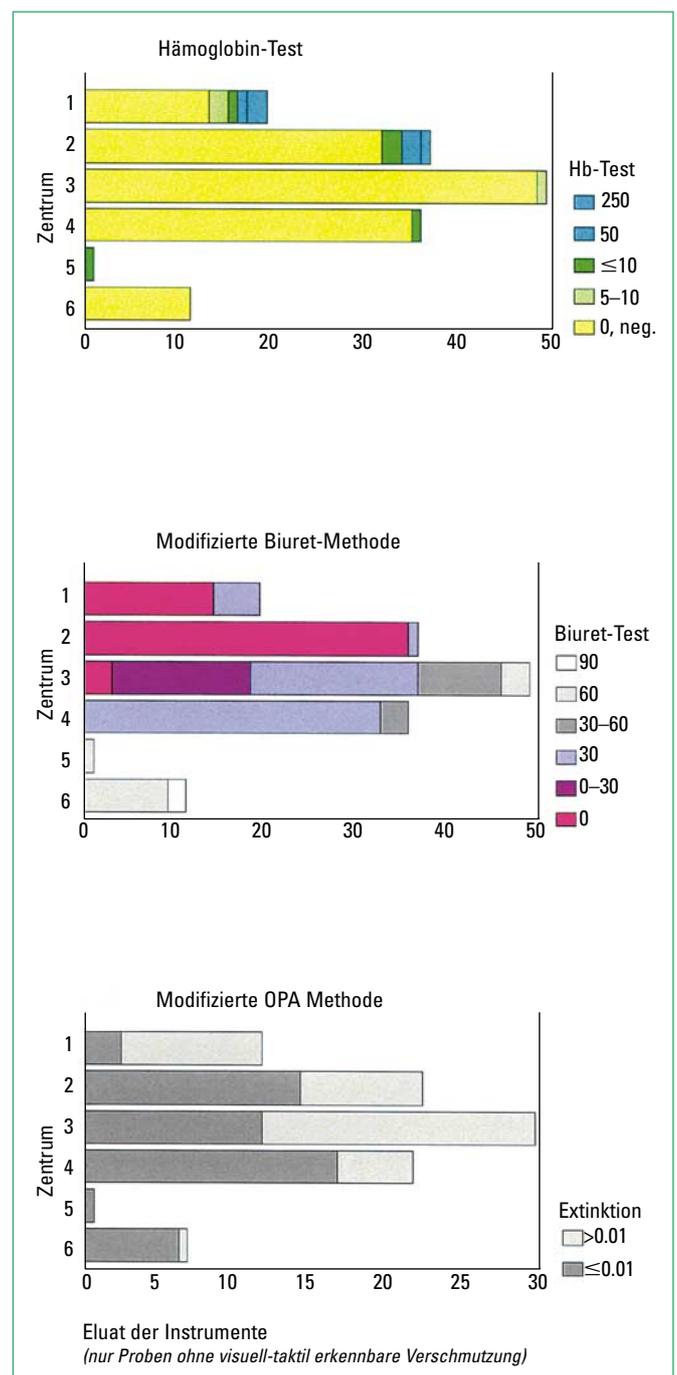


Abb. 2 Ergebnisse der drei Methoden in den Zentren (n = 150)

zu ungenau heraus. Für alle Tests, die eingesetzt werden und nicht wie die OPA-Methode „automatisch“ zu einem quantitativen Ergebnis führen, sollte von allen Beurteilern, die an einer Studie teilnehmen, vor Versuchsbeginn ein einheitliches Kategorienschema entwickelt werden. Die Angaben der Untersucher auf dem Instrumentenbegleitschein waren nicht immer eindeutig interpretierbar bzw. auch unvollständig.

– Problematisch für die Interpretation der Ergebnisse sind zu viele Untergruppen. Je kleiner die Fallzahl, desto kleiner sollte die Anzahl der potentiellen Untergruppen sein. Beschränkung: nur visuell-taktil „saubere“ Instrumente untersuchen; entweder alle Proben mit oder alle Proben ohne Ultraschall, Neutralisator usw.; auch Maschinentyp, Programmart oder das Reinigungsmittel können das Ergebnis beeinflussen, daher nicht zu viele unterschiedliche Arten anwenden.

– Wichtig ist, dass die Instrumente, die in den Versuch eingehen, jeweils aus unterschiedlichen Waschdurchgängen stammen. Die Ergebnisse der Instrumente aus einer Charge sind nicht unabhängig voneinander: Die Maschine oder das Reinigungsmittel können „versagen“, die Instrumente in einem Waschdurchgang könnten die Verschmutzung „verschleppen“ usw.

– Neben diesen systematischen Einflüssen, die bei optimiertem Design und korrekter Versuchsdurchführung minimiert bzw. eliminiert werden können, treten bei jeglicher Datenerhebung Fehler auf, die zum Teil minimiert, aber kaum eliminiert werden können, etwa eine Verzerrung (Bias) durch den Vorgang der Elution selbst oder durch den Untersucher. Ganz gravierend ist natürlich der Einfluss durch die klinische Verschmutzung selbst. Deren Ausmaß und Streuung können nicht beurteilt werden. Entsprechend ist darauf zu achten, dass der Einfluss anderer Faktoren so gering wie möglich gehalten wird.

Positive Ergebnisse hinsichtlich einer klinischen Restkontamination auf verschiedenen Instrumentenoberflächen erlauben keinen Rückschluss auf kli-

nisch-pathologische Relevanz, insbesondere nicht im Hinblick auf nosokomiale Infektionen. Um ursächliche Zusammenhänge von verschmutzten Instrumenten mit erkrankten Patienten aufdecken zu können, wird ein anderes Studien-Design benötigt („Missing Link“). Entsprechende Untersuchungen dürften bei der Vielzahl eingesetzter Instrumente bei einer chirurgischen Operation und aufgrund der Vielzahl weiterer Einflussfaktoren (Partikel in OP-Luft, durchfeuchtete OP-Masken, unsteriles Arbeiten intra- und postoperativ) nur selten zu einem eindeutigen Ergebnis kommen (19). Epidemiologische Studien wiederum sind oft auf „weiche“ Daten, z.B. aus Akten angewiesen und vieldeutig interpretierbar. Deshalb ist die klinikspezifische Verfahrensvalidierung im Sinne einer Qualitätssicherung die einzige Möglichkeit, etwaige Unsicherheiten hinsichtlich der Verfahrensqualität zu beseitigen.

Die hier getroffenen Aussagen zum Ist-Zustand der Sterilgutaufbereitung sollten nunmehr zur Phase 2 der Studie führen, in der die klinische Ist-Erfassung mit einem einzigen Instrumententyp (Kornzange) fortgeführt wird. Letztendlich geht es um die Verifizierung der Reinigungsleistung. Neben der Erfassung physikalischer und Maschinenspezifischer Parameter wird eine Dokumentation der Reinigungsleistung selbst benötigt. ❄

## Danksagung

Diese Studie wäre ohne die Unterstützung der Interessengruppe Reinigung bei der (maschinellen) Aufbereitung (IRA) nicht möglich gewesen.

## Literatur

- Chan-Myers H, McAlister D, Antonoplos P: Natural bioburden levels detected on rigid lumened medical devices before and after cleaning. *Am J Infect Control* 1997; 25 (6): 471–476.
- Chu NS, McAlister D, Antonoplos PA: Natural bioburden levels detected on flexible gastrointestinal endoscopes after clinical use and manual cleaning. *Gastrointest Endosc* 1998; 48 (2): 137–142.
- Coghill SB, Mason CH et al.: Endoscopic biopsy forceps and transfer of Tissue between cases. *Lancet* 1998; (18): 388–389.
- Des Coteaux JG, Poulin EC, Julien M, Guidoin R: Residual organic debris on processed surgical instruments. *AORN* 1995; 62 (1): 23–30.
- Exner M, Tuschewitzky GJ, Scharnagel J: Influence of biofilms by chemical disinfectants and mechanical cleaning. *Zentralbl Bakteriell Mikrobiol Hyg* 1987; [B]183 (5–6): 549–563.
- Fengler TW, Pahlke H, Kraas E: Clinical suitability of laparoscopic instrumentation. Prospective clinical study of function and hygiene. *Surg Endosc* 2000; 14 (4): 388–394.
- Frister H, Meisel H, Schlimme E: Modifizierte OPA-Methode zur Charakterisierung von Proteolyse-Produkten. *Milchwissenschaft* 1986; (41): 483–486.
- Kirst E, Jahn D: Einsatz der Isotopen-Indikator-Methode für die Untersuchung von Reinigungssystemen unter Alltagsbedingungen in der Milchindustrie. *Z Gesamte Hyg* 1987; 33 (10): 529–531.
- Marshburn PB, Rutala WA, Wannamaker NS, Hulka JF: Gas and Steam Sterilization of Assembled and Disassembled Laparoscopic Equipment. *Microbiological Studies*. *J Reprod Med*. 1991; 36 (7): 483–487.
- Medizinprodukte-Gesetz. In: *Handbuch für Medizintechnik*. Ecomed-Verlag, Landsberg (1996).
- Michels W: Bewertung eines Schnelltests zur Überprüfung des Reinigungserfolgs aufbereiteter chirurgischer minimalinvasiver Instrumente. *Hyg Med* 1997; 22 (4): 173–184.
- Michels W, Fengler TW, Pahlke H, Frister M: Anforderungen an die Reinigung bei der chirurgischen Instrumenten-Aufbereitung. *Krh.-Hyg. + Inf.verh.* 2000; 22 (2): 45–49.
- Nyström B: Disinfection of surgical instruments. *J Hosp Inf* 1981; (2): 363–368.
- Ojajärvi J: Grundlagen der Dekontamination. *Zentr Steril* 1993; 1: 277–282.
- Rijnaarts HHM, Norde W, Bouwer EJ, Lyklema J: Bacterial adhesion under static and dynamic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 1993; 59: 3255–3265.
- Roth K, Heeg P, Reichl R, Bueß GF: Aufbereitung von Einmalartikeln – Möglichkeiten und Grenzen. Abstract XXVIII. Kongress d. Dtsch. Ges. f. Endoskopie u. bildgebende Verfahren 25. – 28.3.1998, München. In: *Endoskopie heute* 1998; 11 (1): 135.
- Rioufol C, Devys C, Cachefo A, Meunier G et al.: Bakterielle Biofilme und Endotoxine. *Zentr Steril* 1996; 4: 143–150.
- Rutula WA, Gergen MF, Jones JF, Weber DJ: Levels of microbial contamination on surgical instruments. *Am J Infect Control* 1998; 26 (2): 143–145.
- Rutula WA, Weber DJ, Thomann CA: Outbreak of wound infections following outpatient podiatric surgery due to contaminated bone drills. *Foot Ankle* 1987; 7 (6): 350–354.