

# Proteinrückstände Erklärung

## Proteinrückstände auf Instrumenten messen – Ein Erklärungsversuch

Alain Carballo, Inselspital Bern

Angeregt durch meine Vorgesetzte habe ich (versucht) die unterschiedlichen Test-Möglichkeiten Proteinrückstände zu messen etwas genauer zu betrachten. Zuerst dachte ich es sei einfach, aber kaum war ich eingestiegen sind viele Fragen aufgetaucht und die Antwort auf eine Frage hat schon direkt die nächste Frage ausgelöst.

### WARUM IST ES RELEVANT «GEWORDEN» PROTEINRÜCKSTÄNDE ZU MESSEN?

Bei Weiterbildungen und Seminaren höre ich immer mehr über dieses Thema. Wir in unserer ZSVA messen regelmässig Proteinrückstände an den Instrumenten und wir machen uns Gedanken über die Toleranzgrenze – diese soll gem. Aussagen von Experten, von 100 µg<sup>1</sup> pro Instrument heute, in Zukunft deutlich tiefer sein.

1995 richteten sich die Augen der ganzen Welt auf UK. Der Rinderwahnsinn war Ursache für viele Todesfälle in vielen Länder, aber die meisten Todesfälle gab es in UK.

Ende der achtziger und Anfang der neunziger Jahre erreichte die Gefährdung durch BSE-verseuchtes Rindfleisch ihren Höhepunkt. Danach ergriffen die betroffenen Länder drastische Gegenmaßnahmen in der Viehzucht. Dazu zählten unter anderem Tests auf BSE bei Schlachtrindern. Die EU-Kommission bezahlte dabei die Hälfte der rund 20 Euro pro Test. Die Creutzfeldt Jakob Krankheit kann noch Jahrzehnte nach der Infektion auftreten. Bisher erfassten die Behörden in Großbritannien 177 tödliche Erkrankungen – während vermutlich Millionen Menschen der Gefährdung durch die BSE-Erreger ausgesetzt waren. Außerhalb Großbritanniens wurden bisher 51 tödliche Erkrankungen registriert.

Die moderne Variante der Creutzfeldt Jakob-Krankheit ist in Großbritannien weiter verbreitet als bisher angenommen: Eine Londoner Studie, die 2013 im «British Medical Journal» veröffentlicht wurde, deutet darauf hin, dass bei den Briten einer von 2000 Bürgern den «Erreger» in sich trägt, selbst wenn bisher die wenigsten die Krankheit entwickelten. Das Forscherteam kam mit einer Hochrechnung zu diesem Ergebnis, nachdem es Gewebeproben von mehr als 32.000 Blinddarmoperationen aus 41 verschiedenen Krankenhäusern untersucht hatte. Zuvor waren Experten davon ausgegangen, dass nur etwa jeder 4000. Brite den Erreger in sich trägt. Die Studienautoren weisen darauf hin, dass auch künftig streng darüber gewacht werden muss, die Zahl der Creutzfeldt-Jakob-Erkrankungen nicht durch Bluttransfusionen und mangelnde Vorsicht bei Operationen zu erhöhen.

Es gilt heute als nahezu gesichert, dass die neue Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (vCJD) durch den Verzehr von Rindfleisch entsteht, das mit BSE (Bovine Spongiforme Enzephalopathie) verseucht ist. Der sogenannte Rinderwahn wird von Prionen verursacht, also atypisch gefalteten Eiweissmolekülen. Auch beim Menschen zerstören die Erreger der tödlichen Krankheit das Gehirn, das sich dann schwammartig auflöst. Dies führt zu ähnlichen Symptomen wie beim Rinderwahnsinn.

Aus diesem Unheil ist das Bedürfnis entstanden die Proteinrückstände zu erfassen und in Grossbritannien liegen die Toleranzwerte teilweise (je nach Instrument) bei 1 µg pro Instrument.

### WIE KÖNNEN WIR MESSEN?

Es gibt verschiedene Methoden um Reste von Proteinen ausfindig zu machen. Im Labor kann man alles messen. Für die ZSVA gibt es ein paar wenige Produkte auf dem Markt. Die Messmethoden basieren alle auf verschiedenen biochemischen Reaktionen und sie unterscheiden sich in ihren Ergebnissen. Es gibt quantitative, halb-quantitative, qualitative oder halb-quantitative Messmethoden, abhängig vom Reagenz, aber auch von verschiedenen Parametern wie Temperatur, Zeit, pH des Waschmittels, oder von anderen Faktoren, die einen Einfluss auf das Resultat haben und es verfälschen können. Die am meis-

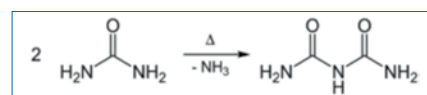
ten verwendeten Reagenzien und Methoden sind Biuret, BCA (Bicinchoninsäure), Ninhydrin und die OPA-Methode (= modifizierte Methode mit Orthophthaldialdehyd). Das kommt uns aus der Norm SN EN ISO 15883 bekannt vor. Die OPA-Methode habe ich nicht weiter recherchiert, weil sie für eine ZSVA nicht in Frage kommt. Sie eignet sich für Messungen in einem Labor und ist sehr aufwändig. Bei der Frage wann eine Messung qualitativ oder halbqualitativ ist, bin ich nicht schlüssig geworden. Dieser Frage bin ich nicht weiter nachgegangen, denn für die ZSVA benötigen wir die Primärinformation, ob eine Messung quantitativ, semiquantitativ oder eine JA/Nein-Methode ist.

### BIURET UND BCA

Der Name Biuret leitet sich von der chemischen Verbindung Carbamoylharnstoff ab. Dabei steht «Bi» für zwei und Uret kommt von Urea, der lateinischen Bezeichnung für Harnstoff. Biuret ist eine natürliche organische Verbindung, die beim Erhitzen von Harnstoff entsteht, wenn dabei zwei Moleküle des Harnstoffs kondensieren und gleichzeitig ein Molekül Ammoniak abgespalten wird. In einer alkalischen Lösung mit Kupfer-Ionen kommt es zu einem violetten Farbkomplex. Letzteres erlaubt den Nachweis von Biuret.

Eine Bestimmung von Proteinen ist damit nicht möglich, da keine visuell deutlich differenzierbaren Färbungen geliefert werden. Biuret ist eigentlich ein Molekül das nachgewiesen werden kann.

Ein ähnlicher Farbton wie beim Nachweis von Biuret entsteht bei der *Biuretreaktion* mit *Proteinen*. In *wässrigen Lösungen* kann diese natürliche Reaktion für den Nachweis von *Proteinen* verwendet werden. So kann in der klinischen Diagnostik mittels der *Biuret-methode nach Weichselbaum* das Gesamtprotein in *Körperhöhlenergüssen (Transsudaten und Exsudaten)* bestimmt werden. Was hier speziell ist, dass nicht Biuret «nachgewiesen» wird. Nein, an die Stelle von Biuret treten Peptide<sup>2</sup> als Verbindungen für das Kupfer-Ion.



<sup>1</sup> LVRD: Leitlinie von DGKH, DGSV und AKI für die Validierung und Routineüberwachung maschineller Reinigungs- und thermischer Desinfektionsprozesse für Medizinprodukte und zu Grundsätzen der Geräteauswahl.

<sup>2</sup> Peptid: ist eine organische Verbindung. Peptide unterscheiden sich von Proteinen vor allem durch ihre molaren Massen. Sie dürfen als kleine Proteine betrachtet werden.

Den Namen Biuret hat diese Reaktion nur, weil die Verbindungen und das Kupfer-Ion in dieser Reaktion ähnlich sind wie bei der Entstehung von Biuret. Und weil der Farbton der hier zustande kommt auch ähnlich ist. (Das Reagenz ist nicht das Biuret-Molekül). Die «Modifizierung» dieser Biuret-Reaktion zur sogenannten BCA-Methode steigert erst signifikant die Empfindlichkeit, so dass Proteinmengen im Mikrogramm Bereich sicher messbar sind. Die Kurzbezeichnung BCA kommt von der chemischen Verbindung Bicinchoninsäure (Bicinchoninic acid). Diese Säure bildet mit Kupfer-Ionen und Peptiden eine Komplexverbindung mit intensiver purpurroter Farbe.

Die Reaktion ist proportional zu der Anzahl Peptiden, was die hohe Empfindlichkeit und Genauigkeit erklärt. Die BCA Reaktion wird in der Biochemie sogar zur quantitativen, photometrischen Bestimmung von Proteinen verwendet.

### NINHYDRIN

Ninhydrin dient als Reagenz zum Nachweis von Ammoniak und Aminosäuren<sup>3</sup>. Es ist als Nachweis- und Bestimmungsmethode für Aminosäuren, aber auch für Proteine die bekannteste und gebräuchlichste Nachweismethode. Durch Abspaltung und Veränderung der Moleküle entsteht eine intensive violette Verfärbung, die proportional zur Konzentration der Aminosäuren ist. Dies lässt eine halbquantitative Messung von Proteinen zu.

Ninhydrin wird häufig auch als Sprühreagenz, z.B. bei der Papierchromatografie oder Dünnschichtchromatografie, verwendet. Eine weitere auf dieser Reaktion basierende Anwendung ist die Erstellung von Fingerabdrücken. Da im Schweiß Aminosäuren vorkommen, können diese mit Ninhydrin reagieren und die Fingerabdrücke sichtbar machen.

In der Norm SN EN ISO 15883 wird eine Ninhydrin-Methode beschrieben, welche nur eine Ja/Nein Aussage zulässt. Durch meine Recherchen komme ich jedoch zum Schluss, dass die Ninhydrin-Methode eine sehr gute Methode für den Alltag ist, und dass halb-quantitative Messungen mit hohen Sensitivitäten (d. h. sehr kleine Mengen werden erfasst) damit doch möglich sind.

<sup>3</sup> Aminosäure: sind organische Verbindungen. Meistens sind damit Protein-eigene Aminosäuren gemeint (also Bausteine von Proteinen). Es gibt aber auch synthetisch hergestellte Aminosäuren und solche die nicht zu Proteinen gehören.

<sup>4</sup> HTM 2030: Britische Richtlinie für die Reinigung/Desinfektion von chirurgischen Instrumenten.

In der ZSVA im Inselehospital benutzen wir einen einfachen Test, hergestellt von 3M, den «Clean Trace Oberflächenprotein Hoch sensitiv». Dieser Test basiert auf der BCA-Methode. Die Ergebnisse des Tests sind von Zeit und Temperatur abhängig. Durch Veränderung von Zeit und Temperatur können unterschiedliche Nachweisgrenzen erzielt werden. Es gibt eine Tabelle, die Grenzen gem. SN EN ISO 15883 und der Britischen Richtlinie HTM 2030<sup>4</sup> empfiehlt.

### PERSÖNLICHES STATEMENT

Bei Unsicherheiten oder persönlichem Interesse sollte ein Mitarbeiter immer den Mut haben Fragen stellen zu dürfen. Fragen ist ein Zeichen von Weisheit.

Als ich anderen Personen zu diesem Thema Fragen gestellt habe, erhielt ich folgende Antworten:

- Warum sollte Ich über dieses Thema etwas wissen? Ich bin sowieso nicht die zuständige Person für diesen Protein-Test.
- Wieso ist es wichtig?
- Benötigen wir wirklich einen Protein Test? Reicht nicht eine visuelle Kontrolle? Denn mit einer nachfolgenden Sterilisation werden alle Mikroorganismen getötet!

Eine professionelle Leistung zeichnet sich durch Wille, Interesse und Engagement aus, weniger durch Einkommen. Wenn wir die Aufbereitung korrekt und pflichtbewusst ausführen, wird dies geschätzt. Von den Chirurgen, dem Personal und auch vom Patienten.

Um Wissen zu erweitern sind Diskussionen, Meinungsverschiedenheiten, Kritik, Geduld und Hilfsbereitschaft und gute Zusammenarbeit sehr wichtig.

Am letzten Kongress des SGSV in Regensburg wurde über die Toleranzgrenze für Proteinrückstände auf Instrumenten gesprochen. Die Grenze soll nach unten verschoben werden, also strenger werden. Dies zeigt, dass dieses Thema doch sehr wichtig ist. Blut und Geweberückstände bestehen aus Proteinen. Mikroorganismen bestehen aus Proteinen und Aminosäuren und Peptiden. Das ist das Ding das wir reinigen sollen. Dies lässt gar keine Diskussion zu über die Wichtigkeit. Es ist ein MUSS.

Im STE-1 habe ich gelernt, dass von toten Keimen und denaturierten Proteinen Toxine abgehen könne, sogenannte Pyrogene. Diese können allergische Reaktionen und Infektionen auslösen.

Wenn wir also nicht gut reinigen, weil wir meinen die Sterilisation löst alle Probleme, dann sind wir nicht ganz im Bilde. Aber den Satz «sterilen Dreck gibt es nicht» kennen wir ja eigentlich alle.

Ich bin dankbar für das was ich durch die Auseinandersetzung mit diesem Thema gelernt habe. |

# -ebro®

## Elektronischer Bowie-Dick-Test & Chargenkontrolle PCD mit EBI-16



Der neue EBI-16-Datenlogger von ebro liefert ein klares Ergebnis beim täglichen Luftentfernungs- und Dampfdurchdringungstest nach DIN EN 285 und EN ISO 11140-4.

- Erkennung möglicher Fehlfunktionen im Sterilisator.
- Selbst kleinste Mengen Restluft werden nachgewiesen.
- Vakuumtest gemäss DIN EN 285
- Messung der Sterilisationstemperatur und der Sterilisationszeit bei 134°C/3.5 Minuten (DIN EN 285)
- Berechnung der theoretischen Dampftemperatur (Anzeige des überhitzten Dampfes).

## Druck- & Temperatur-Datenlogger (auch Funk)



Für Routinekontrolle und Validierung sind die ebro-Datenlogger bestens geeignet.

- Kontrolle von Steckbecken, RDA's (auch Spüldruck) und Dampfsteris (Druck und Temperatur)
- robust und präzise
- einfache Handhabung
- leichtverständliche Software
- automatische Berechnung A<sub>0</sub>-Werte

### ebro Electronic GmbH

Dorfstrasse 26d / 8902 Urdorf  
Tel. 044 777 17 63 / Fax 64  
Email: info@ebro-ch.ch  
Web: www.ebro-ch.ch