

DIN EN ISO 15883-5



ICS 11.080.10

Entwurf

Einsprüche bis 2020-07-01
Vorgesehen als Ersatz für
DIN ISO/TS 15883-5:2006-02;
Ersatz für
E DIN EN ISO 15883-5:2019-07

**Reinigungs-Desinfektionsgeräte –
Teil 5: Leistungsanforderungen und Kriterien für Prüfverfahren zum
Nachweis der Reinigungswirkung (ISO/DIS 15883-5:2019);
Deutsche und Englische Fassung prEN ISO 15883-5:2019**

Washer disinfectors –

Part 5: Performance requirements and test method criteria for demonstrating cleaning efficacy (ISO/DIS 15883-5:2019);

German and English version prEN ISO 15883-5:2019

Laveurs désinfecteurs –

Partie 5: Terrains d'essai et méthodes pour démontrer l'efficacité de nettoyage (ISO/DIS 15883-5:2019);

Version allemande et anglaise prEN ISO 15883-5:2019

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2020-05-01 wird der Öffentlichkeit zur Prüfung und Stellungnahme vorgelegt.

Weil die beabsichtigte Norm von der vorliegenden Fassung abweichen kann, ist die Anwendung dieses Entwurfs besonders zu vereinbaren.

Stellungnahmen werden erbeten

- vorzugsweise online im Norm-Entwurfs-Portal von DIN unter www.din.de/go/entwuerfe bzw. für Norm-Entwürfe der DKE auch im Norm-Entwurfs-Portal der DKE unter www.entwuerfe.normenbibliothek.de, sofern dort wiedergegeben;
- oder als Datei per E-Mail an named@din.de möglichst in Form einer Tabelle. Die Vorlage dieser Tabelle kann im Internet unter www.din.de/go/stellungnahmen-norm-entwuerfe oder für Stellungnahmen zu Norm-Entwürfen der DKE unter www.dke.de/stellungnahme abgerufen werden;
- oder in Papierform an den DIN-Normenausschuss Medizin (NAMed), 10772 Berlin oder Saatwinkler Damm 42/43, 13627 Berlin.

Die Empfänger dieses Norm-Entwurfs werden gebeten, mit ihren Kommentaren jegliche relevanten Patentrechte, die sie kennen, mitzuteilen und unterstützende Dokumentationen zur Verfügung zu stellen.

Gesamtumfang 130 Seiten

DIN-Normenausschuss Medizin (NAMed)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 15883-5:2019) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 198 „Sterilization of health care products“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 102 „Sterilisatoren und zugehörige Ausrüstung für die Aufbereitung von Medizinprodukten“, dessen Sekretariat von DIN (Deutschland) gehalten wird, sowie unter Beteiligung deutscher Experten erarbeitet.

Das zuständige deutsche Normungsgremium ist der Arbeitsausschuss NA 063-04-09 AA „Reinigungs-Desinfektionsgeräte“ im DIN-Normenausschuss Medizin (NAMed).

Der Norm-Entwurf wird der Öffentlichkeit zum zweiten Mal zur Kommentierung gestellt, um die in der ersten Entwurfs-Veröffentlichung fehlenden informativen Anhänge C, D und E nachzuliefern. Eine Kommentierung ist in diesem Fall nur noch zur Übersetzung des Dokumentes und den ergänzten Anhängen möglich.

Um Zweifelsfälle in der Übersetzung auszuschließen, ist die englische Originalfassung beigelegt. Die Nutzungsbedingungen für den deutschen Text des Norm-Entwurfes gelten gleichermaßen auch für den englischen Text.

Für die in diesem Dokument zitierten internationalen Dokumente wird im Folgenden auf die entsprechenden deutschen Dokumente hingewiesen:

ISO 10993-1	siehe	DIN EN ISO 10993-1
ISO 10993-5	siehe	DIN EN ISO 10993-5
ISO 10993-12	siehe	DIN EN ISO 10993-12
ISO 11737-1	siehe	DIN EN ISO 11737-1
ISO 14971	siehe	DIN EN ISO 14971
ISO 15883-1:2006/Amd1:2014	siehe	DIN EN ISO 15883-1:2014-10
ISO 17664	siehe	DIN EN ISO 17664
ISO/IEC 17025	siehe	DIN EN ISO/IEC 17025

Aktuelle Informationen zu diesem Dokument können über die Internetseiten von DIN (www.din.de) durch eine Suche nach der Dokumentennummer aufgerufen werden.

Änderungen

Gegenüber DIN ISO/TS 15883-5:2006-02 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) Änderung der Nummer aus ISO/TS wird eine EN ISO.
- b) Das Konzept des Standards wurde geändert. Die Reinigungswirkung von Reinigungs- und Desinfektionsgeräten wurde traditionell anhand verschiedener Prüfanschmutzungen und -methoden, die in verschiedenen Ländern eingesetzt wurden, nachgewiesen.

Die künftige Norm standardisiert hingegen Prüfverfahren, die zum Nachweis der Reinigungswirkung von Reinigungs-Desinfektionsgeräten und deren Zubehör verwendet werden können und gibt Beispiele von geeigneten Prüfanschmutzungen.

Die individuellen Anforderungen an die verschiedenen Arten von Reinigungs- und Desinfektionsgeräten und Anwendungen zur Wiederaufbereitung von Geräten können variieren, aber dieses Dokument liefert die Grundlage für den Nachweis der Reinigungswirkung.

- c) Ergänzung des Anhang ZA einschließlich Tabelle ZA.1 „Zusammenhang zwischen dieser Europäischen Norm und den grundlegenden Anforderungen der abzudeckenden Richtlinie 93/42/EWG“ über Medizinprodukte sowie des Anhang ZB einschließlich Tabelle ZB.1 „Zusammenhang zwischen dieser Europäischen Norm und den allgemeinen Sicherheits- und Leistungsanforderungen der abzudeckenden Verordnung (EU) 2017/745“ über Medizinprodukte.

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN EN ISO 10993-1, *Biologische Beurteilung von Medizinprodukten — Teil 1: Beurteilung und Prüfungen im Rahmen eines Risikomanagementsystems*

DIN EN ISO 10993-5, *Biologische Beurteilung von Medizinprodukten — Teil 5: Prüfungen auf In-vitro-Zytotoxizität*

DIN EN ISO 10993-12, *Biologische Beurteilung von Medizinprodukten — Teil 12: Probenvorbereitung und Referenzmaterialien*

DIN EN ISO 11737-1, *Sterilisation von Produkten für die Gesundheitsfürsorge — Mikrobiologische Verfahren — Teil 1: Bestimmung der Population von Mikroorganismen auf Produkten*

DIN EN ISO 14971, *Medizinprodukte — Anwendung des Risikomanagements auf Medizinprodukte*

DIN EN ISO 15883-1:2014-10, *Reinigungs-Desinfektionsgeräte — Teil 1: Allgemeine Anforderungen, Begriffe und Prüfverfahren (ISO 15883-1:2006 + Amd 1:2014); Deutsche Fassung EN ISO 15883-1:2009 + A1:2014*

DIN EN ISO 17664, *Aufbereitung von Produkten für die Gesundheitsfürsorge — Vom Medizinprodukt-Hersteller bereitzustellende Informationen für die Aufbereitung von Medizinprodukten*

DIN EN ISO/IEC 17025, *Allgemeine Anforderungen an die Kompetenz von Prüf- und Kalibrierlaboratorien*

Reinigungs-Desinfektionsgeräte — Teil 5: Leistungsanforderungen und Kriterien für Prüfverfahren zum Nachweis der Reinigungswirkung (ISO/DIS 15883-5:2019)

Laveurs désinfecteurs — Partie 5: Terrains d'essai et méthodes pour démontrer l'efficacité de nettoyage (ISO/DIS 15883-5:2019)

Washer disinfectors — Part 5: Performance requirements and test method criteria for demonstrating cleaning efficacy (ISO/DIS 15883-5:2019)

ICS:

Deskriptoren:

Dokument-Typ: Europäische Norm
Dokument-Untertyp:
Dokumentstufe: zweite parallele Umfrage
Dokumentsprache: D

STD Version 2.10b

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	4
Vorwort	5
Einleitung	6
1 Anwendungsbereich	7
2 Normative Verweisungen	7
3 Begriffe	7
4 Leistungsanforderungen	8
4.1 Allgemeines	8
4.2 Betrachtungen zu Prüfanschmutzungen	9
4.3 Betrachtungen zur Beladung	10
4.4 Prüfkriterien für die Reinigungswirksamkeit	10
4.4.1 Allgemeines	10
4.4.2 Sichtprüfung	11
4.4.3 Analysenkriterien	11
4.4.4 Prozessrückstände	12
5 Prüfung auf Übereinstimmung	13
5.1 Validierung von Reinigungsprüfverfahren	13
5.1.1 Allgemeines	13
5.1.2 Verfahren für die Anschmutzung der Beladung	13
5.1.3 Nachweisverfahren	13
5.1.4 Verfahren für die Bestimmung des Analyten	13
5.2 Anforderungen an das Reinigungs-Desinfektionsgerät	14
5.3 Typprüfung hinsichtlich Reinigung	14
5.3.1 Kurzbeschreibung	14
5.3.2 Reagenzien/Materialien	14
5.3.3 Durchführung	14
5.3.4 Akzeptanzkriterien	14
5.4 Prüfung zur Leistungsqualifizierung der Reinigung	15
5.4.1 Kurzbeschreibung	15
5.4.2 Reagenzien/Materialien	15
5.4.3 Durchführung	15
5.4.4 Akzeptanzkriterien	15

5.5	Prozessrückstände.....	15
5.5.1	Allgemeines	15
5.5.2	Risikoanalyse	15
5.5.3	Betrachtungen zur Zytotoxizität.....	16
5.5.4	Probenahmeverfahren.....	16
Anhang A (informativ) Beispiele für Prüfanschmutzungen		17
Anhang B (normativ) Beurteilung der Leistung von Prüfanschmutzungen		20
Anhang C (informativ) Beispiele für Prüfmethoden zur Ermittlung und zur Beurteilung restlicher Proteinkontamination		45
Anhang D (informativ) Beispiele für Prüfmethoden zur Ermittlung von Hämoglobin zur Beurteilung der Reinigungswirkung.....		50
Anhang E (informativ) Leistungsbeurteilung mit Prüfanschmutzung – Muster-Ergebnisblätter.....		54
Anhang ZA (informativ) Zusammenhang zwischen dieser Europäischen Norm und den grundlegenden Anforderungen der abzudeckenden Richtlinie 93/42/EWG [OJ L 169]		60
Anhang ZB (informativ) Zusammenhang zwischen dieser Europäischen Norm und den grundlegenden Sicherheits- und Leistungsanforderungen der abzudeckenden Verordnung (EU) 2017/745		61
Literaturhinweise.....		63

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 15883-5:2019) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 198 „Sterilization of health care products“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 102 „Sterilisatoren und zugehörige Ausrüstung für die Aufbereitung von Medizinprodukten“ erarbeitet, dessen Sekretariat von DIN gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur zweiten parallelen Umfrage vorgelegt.

Dieses Dokument wird ISO/TS 15883-5:2005 ersetzen.

Dieses Dokument wurde im Rahmen eines Mandats erarbeitet, das die Europäische Kommission und die Europäische Freihandelszone CEN erteilt haben, und unterstützt grundlegende Anforderungen der EU-Richtlinien.

Zum Zusammenhang mit EU-Richtlinien siehe informativen Anhang ZA und informativen Anhang ZB, die Bestandteil dieses Dokuments sind.

Die folgenden in Bezug genommenen Dokumente sind für die Anwendung dieses Dokuments erforderlich. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe des in Bezug genommenen Dokuments (einschließlich aller Änderungen). Bei datierten Verweisungen gilt nur die in Bezug genommene Ausgabe. Jedoch sollte der Anwender bei der Anwendung dieser Norm im Sinne von Anhang ZA stets überprüfen, ob in Bezug genommene Dokumente ersetzt worden sind und ob deren betreffende Inhalte weiterhin als der allgemein anerkannte Stand der Technik erachtet werden können.

Wenn im Text der ISO-Norm auf eine IEC- oder ISO-Norm verwiesen wird, muss dies als normative Verweisung auf die entsprechende EN-Norm, sofern vorhanden, und andernfalls auf die datierte Ausgabe der ISO- oder IEC-Norm, wie unten aufgeführt, verstanden werden.

ANMERKUNG Die Art und Weise, wie auf diese in Bezug genommenen Dokumente in normativen Anforderungen verwiesen wird, bestimmt das Ausmaß (als Ganzes oder teilweise), in dem sie gelten.

Tabelle — Zusammenhang zwischen undatierten normativen Verweisungen und datierten EN- und ISO-Normen

Normative Verweisungen wie in Abschnitt 2 der ISO-Norm aufgeführt	Entsprechende datierte Norm	
	EN	ISO oder IEC
ISO 15883-1	EN ISO 15883-1:2009+A1:2014	ISO 15883-1:2006+Amd1:2014
ISO 10993-1	EN ISO 10993-1:— ^a	ISO 10993-1:2018
ISO 10993-5	EN ISO 10993-5:2009	ISO 10993-5:2009

^a In Vorbereitung.

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO/DIS 15883-5:2019 wurde von CEN als prEN ISO 15883-5:2019 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

Vorwort

ISO (die Internationale Organisation für Normung) ist eine weltweite Vereinigung nationaler Normungsinstitute (ISO-Mitgliedsorganisationen). Die Erstellung von Internationalen Normen wird üblicherweise von Technischen Komitees von ISO durchgeführt. Jede Mitgliedsorganisation, die Interesse an einem Thema hat, für welches ein Technisches Komitee gegründet wurde, hat das Recht, in diesem Komitee vertreten zu sein. Internationale staatliche und nichtstaatliche Organisationen, die in engem Kontakt mit ISO stehen, nehmen ebenfalls an der Arbeit teil. ISO arbeitet bei allen elektrotechnischen Normungsthemen eng mit der Internationalen Elektrotechnischen Kommission (IEC) zusammen.

Die Verfahren, die bei der Entwicklung dieses Dokuments angewendet wurden und die für die weitere Pflege vorgesehen sind, werden in den ISO/IEC-Direktiven, Teil 1 beschrieben. Es sollten insbesondere die unterschiedlichen Annahmekriterien für die verschiedenen ISO-Dokumentenarten beachtet werden. Dieses Dokument wurde in Übereinstimmung mit den Gestaltungsregeln der ISO/IEC-Direktiven, Teil 2 erarbeitet (siehe www.iso.org/directives).

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente dieses Dokuments Patentrechte berühren können. ISO ist nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren. Details zu allen während der Entwicklung des Dokuments identifizierten Patentrechten finden sich in der Einleitung und/oder in der ISO-Liste der erhaltenen Patenterklärungen (siehe www.iso.org/patents).

Jeder in diesem Dokument verwendete Handelsname dient nur zur Unterrichtung der Anwender und bedeutet keine Anerkennung.

Für eine Erläuterung des freiwilligen Charakters von Normen, der Bedeutung ISO-spezifischer Begriffe und Ausdrücke in Bezug auf Konformitätsbewertungen sowie Informationen darüber, wie ISO die Grundsätze der Welthandelsorganisation (WTO, en: World Trade Organization) hinsichtlich technischer Handelshemmnisse (TBT, en: Technical Barriers to Trade) berücksichtigt, siehe www.iso.org/iso/foreword.html.

Dieses Dokument wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 198, *Sterilization of health care products*, erarbeitet.

Diese erste Ausgabe ersetzt ISO/TS 15883-5:2005.

Eine Auflistung aller Teile der Normenreihe ISO 15883 ist auf der ISO-Internetseite abrufbar.

Rückmeldungen oder Fragen zu diesem Dokument sollten an das jeweilige nationale Normungsinstitut des Anwenders gerichtet werden. Eine vollständige Auflistung dieser Institute ist unter www.iso.org/members.html zu finden.

Einleitung

Die Prüfung der Reinigungswirksamkeit ist ein Schlüsselaspekt der Ermittlung einer zufriedenstellenden Leistung eines Reinigungs-Desinfektionsgerätes (RDG). Diese Prüfung umfasst die Typprüfung unter simulierten Gebrauchsbedingungen und kann durch eine Prüfung zur Leistungsqualifizierung unter klinischen Bedingungen bestätigt werden.

Die Reinigungswirksamkeit von Reinigungs-Desinfektionsgeräten wurde bisher in Bezug auf verschiedene Prüfanschmutzungen und -verfahren nachgewiesen, die in einer Reihe von Ländern angewendet wurden. Dieser Teil von ISO 15883 empfiehlt die Verfahren, einschließlich Beispiele von Prüfanschmutzungen, zur Standardisierung dieser Anforderungen. Die einzelnen Anforderungen für die verschiedenen Typen von Reinigungs-Desinfektionsgeräten und Anwendungen zur Geräteaufbereitung können variieren, jedoch stellt dieses Dokument die Grundlage für den Nachweis der Reinigungswirksamkeit bereit.

Die Prüfung der Reinigungswirksamkeit wird im RDG einschließlich zugehörigen Zubehörs in zwei Phasen durchgeführt:

- Typprüfung unter simulierten Gebrauchsbedingungen mit definierten Prüfanschmutzungen, Anschmutzungsverfahren und Prüfoberflächen/-vorrichtungen, die für das Design und die vorgesehenen Anwendungen repräsentativ sind;
- Prüfung zur Leistungsqualifizierung unter klinischen Bedingungen mit Beladung(en) mit der anspruchsvollsten Anschmutzung, die in der normalen Praxis aufzubereiten ist.

ANMERKUNG Derzeit schließt diese Norm die Verifizierung der Reinigung von Medizinprodukten aus, die möglicherweise Prionen, den Verursachern bei übertragbaren spongiformen Enzephalopathien wie Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJK), ausgesetzt waren.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt Verfahren und Prüfverfahren fest, die zum Nachweis der Reinigungswirksamkeit von Reinigungs-Desinfektionsgeräten (RDG) und ihres Zubehörs, die für die Reinigung von wiederverwendbaren Medizinprodukten und anderen in der medizinischen, zahnmedizinischen, pharmazeutischen und veterinärmedizinischen Praxis verwendeten Gegenständen eingesetzt werden, angewendet werden sollen.

2 Normative Verweisungen

Die folgenden Dokumente werden im Text in solcher Weise in Bezug genommen, dass einige Teile davon oder ihr gesamter Inhalt Anforderungen des vorliegenden Dokuments darstellen. Bei datierten Verweisungen gilt nur die in Bezug genommene Ausgabe. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe des in Bezug genommenen Dokuments (einschließlich aller Änderungen).

ISO 15883-1:2006/Amd1:2014, *Washer-disinfectors — Part 1: General requirements, terms and definitions and tests (under review)*

ISO 10993-1, *Biological evaluation of medical devices — Part 1: Evaluation and testing within a risk management process*

ISO 10993-5, *Biological evaluation of medical devices — Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die Begriffe nach ISO 15883-1 und die folgenden Begriffe.

ISO und IEC stellen terminologische Datenbanken für die Verwendung in der Normung unter den folgenden Adressen bereit:

— ISO Online Browsing Platform: verfügbar unter <http://www.iso.org/obp>

— IEC Electropedia: verfügbar unter <http://www.electropedia.org/>

3.1

Eingriffsgrenze

Wert aus der Überwachung, der ein sofortiges Eingreifen erfordert

Anmerkung 1 zum Begriff: Dies ist der Höchstwert des Analyten, der nicht überschritten werden darf.

[QUELLE: ISO 11139:2018, 3.5, modifiziert — Ergänzung von Anmerkung 1 zum Begriff.]

3.2

Warngrenze

Wert aus der Überwachung, der als Frühwarnung für Abweichungen von spezifizierten Bedingungen dient

Anmerkung 1 zum Begriff: Dies ist der Zielwert des Analyten.

[QUELLE: ISO 11139:2018, 3.11, modifiziert — Ergänzung von Anmerkung 1 zum Begriff.]

3.3

Analyt

chemische Substanz, die Gegenstand einer chemischen Analyse ist

[QUELLE: ISO 11139:2018, 3.12]

3.4

rein

sauber

frei von Anschmutzungen und unterhalb festgeschriebener Level von Analyten

[QUELLE: ISO 11139:2018, 3.45]

3.5

klinische Anwendung

Anwendung eines Produktes für die Gesundheitsfürsorge während einer Behandlung an einem Patienten

[QUELLE: ISO 11139:2018, 3.49]

3.6

Beladung

Produkt, Ausrüstung oder Materialien, die gemeinsam in einem Betriebszyklus aufbereitet werden

[QUELLE: ISO 11139:2018, 3.155]

3.7

Anschmutzung

natürliche oder künstliche Kontamination auf einer Ausrüstung oder einer Oberfläche nach dem tatsächlichen oder simulierten Gebrauch

[QUELLE: ISO 11139:2018, 3.257]

3.8

Prüfanschmutzung

Substanzgemisch, das dazu vorgesehen ist, als Ersatz für Kontaminationen oder Rückstände zu dienen, die nach dem Gebrauch auf einem Medizinprodukt gefunden werden

[QUELLE: ISO 11139:2018, 3.300]

4 Leistungsanforderungen

4.1 Allgemeines

4.1.1 Zusätzlich zu den nachfolgend angeführten Anforderungen (siehe 4.1.3 bis 4.1.5) müssen die relevanten Anforderungen an die Reinigungsleistung der nachfolgenden Teile von ISO 15883, die für den Reinigungs-Desinfektionsgerätetyp zutreffen, gelten.

4.1.2 Zusätzlich zu den nachfolgend angeführten Prüfungen (siehe 4.1.4 bis 4.1.5) müssen die relevanten Reinigungsprüfungen der nachfolgenden Teile von ISO 15883, die für den Reinigungs-Desinfektionsgerätetyp zutreffen, gelten.

4.1.3 Die Bedingungen für die Reinigung, z. B. Stufen, Temperaturen, Druck, Durchfluss, Chemikalien, Beschaffenheit und Menge des Wassers, mit denen die Übereinstimmung des RDG mit den Anforderungen dieser Norm bestätigt wird müssen definiert werden.

ANMERKUNG Bezüglich der Wasserbeschaffenheit siehe ISO 15883-1:2006/Amd1:2014, 5.23.

4.1.4 Für jeden festgeschriebenen Reinigungsabschnitt, z. B. für verschiedene Beladung(en) müssen Prüfungen zur Reinigungswirksamkeit durchgeführt werden (siehe 5.2.1). Während der Prüfungen zur Reinigungswirksamkeit muss das RDG ohne Desinfektions- oder Trocknungsabschnitt betrieben werden.

Wenn Teile des Desinfektionszyklus für eine ausreichende Reinigung als wichtig erachtet werden (z. B. für das Spülen), muss verifiziert werden, dass dieses den Nachweis der Analyte nicht stört, und sollte die Wirksamkeit und Sicherheit des RDG-Prozesses nicht beeinträchtigen.

4.1.5 Die Prüfung der Reinigungswirksamkeit muss im RDG und mit dem für die jeweilige Beladung spezifiziertem Zubehör in zwei Phasen durchgeführt werden:

- a) Typprüfung unter simulierten Gebrauchsbedingungen mit einer oder mehreren definierten Prüfanschmutzungen, einschließlich des/der Analyten und repräsentativer Prüfbeladung(en) (siehe 4.4.1);
- b) Leistungsqualifizierungsprüfung mit der (den) ungünstigsten (en: worst-case) Beladung(en), die durch klinische Anwendung angeschmutzt sind (siehe 4.4.1).

4.2 Betrachtungen zu Prüfanschmutzungen

4.2.1 Die Begründung für die Wahl der Prüfanschmutzung und des Anschmutzungsverfahrens muss begründet und dokumentiert werden. Die Rezepturen der Prüfanschmutzung dürfen auf Grundlage des Studiums der Literatur und des Nachweises ihrer Relevanz bei der Benutzung der Produkte in der klinischen Praxis gewählt oder entwickelt werden. (Siehe Anhang A und Literaturhinweise.)

4.2.2 Die Prüfanschmutzung muss den in Anhang B festgeschriebenen Leistungskriterien entsprechen.

ANMERKUNG In Anhang E sind Muster von Ergebnisblättern für das Eintragen der Daten angeführt.

4.2.3 Die Wahl der Prüfanschmutzung, deren zugehöriges Anschmutzungsverfahren und die Konditionierung (z. B. Trocknen) müssen ungünstigste klinische (worst-case) Anwendungsbedingungen der Produkte nachbilden.

- a) Die Zusammensetzung der Prüfanschmutzung muss mindestens die Konzentration an Analyt(en) enthalten, die für Gewebe/Flüssigkeiten und, sofern zutreffend, sämtliche zugehörigen, verfahrensbedingten Materialien repräsentativ sind, die bei den zur Reinigung vorgesehenen Produkten während ihrer klinischen Anwendung vorkommen (z. B. Kontrastmittel, Schmierstoffe, Zemente usw.).
- b) Das Verfahren der Anwendung der Prüfanschmutzung muss die Gebrauchsbedingungen des (der) Produkte(s), z. B. Kauterisation oder Erhitzen, die eine größere Herausforderung für die Reinigung darstellen, und/oder Druckgradienten, die das Eindringen von Material in die verschiedenen Produkt-Teile begünstigen können, simulieren. Es müssen die Teile des Produkts angeschmutzt werden, die als die am schwierigsten zu reinigenden Teile identifiziert wurden (siehe 4.3).
- c) Nach Anschmutzung des bzw. der Produkte(s) müssen die Transport- und Verweildauerbedingungen (z. B. Temperatur, Zeit, Feuchte) für das (die) Produkt(e) vom Gebrauchsort zur Aufbereitungsstelle und, sofern zutreffend, jegliche Vorbehandlung berücksichtigt werden.

4.2.4 Das Verfahren für die Extraktion (Rückgewinnung) der Prüfanschmutzung von Produkten, die Wirksamkeit der Extraktion und der Nachweis von Analyten müssen validiert werden.

ANMERKUNG Eine angemessene prozentuale Rückgewinnung beträgt mehr als 50 %, sofern nicht anderweitig begründet (siehe 5.1.3.2).

4.3 Betrachtungen zur Beladung

Beladung(en), einschließlich ihrer jeweiligen Produkte, die die typischen und ungünstigsten klinischen (worst-case) Anwendungsbedingungen wiedergeben, müssen definiert und begründet werden. Derartige Beladung(en) muss (müssen) für die Typprüfung und Leistungsqualifizierungsprüfungen hinsichtlich der Reinigungswirksamkeit und der Prozessrückstände verwendet werden [siehe auch ISO 15883-1:2006/Amd1:2014, 8.1b)]. Die Beladung(en) müssen für den untersuchten Reinigungs-Desinfektionsgerätetyp als angemessen erachtet werden.

ANMERKUNG Diese Produkte können Ersatzgegenstände (Surrogate) sein, die für einige Prüfungen verwendet werden könnten, wenn diese sich als repräsentativ für die vorgeschriebene Beladung erwiesen haben.

Alle maßgeblichen physikalischen Eigenschaften des Produkt-Typs/der Produkt-Typen und Patientenkontaktfläche müssen berücksichtigt werden, einschließlich folgenden Eigenschaften, ohne darauf beschränkt zu sein:

- Hohlräume (Lumen);
- Ventile;
- Spalten;
- Gelenke und Verbindungen;
- raue und unregelmäßige Oberflächen;
- Materialzusammensetzung, einschließlich Porosität;
- Anschlussstellen und tote Enden;
- innere bewegliche Teile (z. B. Kabel).

Diese Konstruktionsmerkmale unterliegen einem höheren Risiko der Ansammlung und Zurückhaltung der Anschmutzung und müssen bei der Abschätzung der Reinigungswirksamkeit des gesamten Produkts berücksichtigt werden.

Jede notwendige Vorbehandlung des bzw. der Produkte(s), z. B. manuelle Vorreinigung oder Demontage, muss Bestandteil des Prüfverfahrens sein.

4.4 Prüfkriterien für die Reinigungswirksamkeit

4.4.1 Allgemeines

Die Reinigungswirksamkeit muss durch Sichtprüfung (siehe 4.4.2) und quantitativen Proteinnachweis (siehe Anmerkung 1) bestimmt werden. Sofern möglich, muss mindestens ein anderes validiertes Prüfverfahren zur quantitativen Analyse angewendet werden, um einen oder mehrere andere Analyten zusätzlich zum Protein zu messen.

ANMERKUNG 1 Für die Leistungsqualifizierung und Routineprüfung kann ein validiertes qualitatives Verfahren angewendet werden, wenn die Nachweisgrenze dieses Verfahrens unterhalb der in 4.4.3 angegebenen Analyse Kriterien für die Warn- oder Eingriffsgrenze liegt.

ANMERKUNG 2 Nicht-invasive Produkte, wie diejenigen, die nicht über eine Körperöffnung oder die Körperoberfläche in den Körper eindringen, erfordern möglicherweise nur eine Sichtprüfung. Einige nicht-invasive Produkte können höhere Risikoniveaus darstellen, z. B. Flaschen für Säuglingsnahrung, Kontakttonometer.

ANMERKUNG 3 Typische Analyten sind in 4.4.3.3 angegeben (siehe auch Literaturhinweise).

ANMERKUNG 4 Bezüglich des Ansatzes zur Risikobeurteilung, um die Begründung zu unterstützen, siehe ISO 14971:2007 [3].

4.4.2 Sichtprüfung

Die Sichtprüfung muss das Nichtvorhandensein von sichtbarer Anschmutzung auf allen einsehbaren Oberflächen der Beladung(en) einschließlich Produkt(en) nach der (den) Reinigungsabschnitte(n) nachweisen. Diese Anforderung gilt nicht, wenn die Sichtprüfung der Oberflächen des Produkts aufgrund seiner Konfiguration nicht möglich ist.

ANMERKUNG Angemessene Anforderungen an die Sichtprüfung können Folgendes umfassen:

- definierte Anweisungen für die Untersuchung;
- angemessene Beleuchtung;
- gegebenenfalls Untersuchungshilfen (z. B. Grobvergrößerung, Boroskop);
- Betrachtungsabstand.

Bezüglich weiterer Informationen zur Sichtprüfung siehe EN 13018 [7].

4.4.3 Analysekriterien

4.4.3.1 Allgemeines

Die Akzeptanzkriterien für die Analyten dürfen in Form einer Warngrenze sowie einer Eingriffsgrenze festgeschrieben werden.

Die Warn- und Eingriffsgrenzen für Protein und andere Analyten sind in 4.4.3 und 4.4.4 festgeschrieben. Deren Eingriffsgrenzen sind die maximalen Kriterien für vertretbare Reinigungswirksamkeit bei der Prüfung, die angestrebten Kriterien sind jedoch als Warngrenzen angegeben. Wenn Werte zwischen der Warn- und Eingriffsgrenze nachgewiesen werden, müssen sie untersucht und, sofern begründet, als die Reinigungsanforderungen einhaltend erachtet werden.

Im Sinne der Einhaltung der Anforderungen von ISO 15883-1 muss die Eingriffsgrenze angewendet werden.

4.4.3.2 Analysekriterien für Protein

Die Warn- und Eingriffsgrenze für die Proteinanalysen sind:

- Warngrenze $\geq 3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$;
- Eingriffsgrenze $\geq 6,4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$.

Das maximal zulässige Level an Protein auf einem gereinigten Produkt muss der Begründung entsprechend kleiner als die Eingriffsgrenze (siehe Literaturhinweise [14], [27], [48], [52], [59]) für jede Probe sein.

ANMERKUNG 1 Die Protein-Nachweisverfahren können die in Anhang C angegebenen Verfahren oder, sofern validiert, andere umfassen.

ANMERKUNG 2 Warn- und Eingriffsgrenzen beziehen sich auf die Reinigungswirksamkeit und -leistung und nicht zwangsläufig auf das klinische Risiko. Klinische Maßnahmen auf unzureichende Reinigungsleistung werden von der Art der Instrumente, Verfahren und Patienten-Risikofaktoren abhängen.

4.4.3.3 Analysenkriterien für andere Analyten

Andere Analyten und ihre zulässigen Level, sofern angewendet, auf einem gereinigten Produkt umfassen:

a) gesamter organischer Kohlenstoff (en: total organic carbon, TOC):

- 1) Warngrenze $\geq 6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (siehe Literaturhinweis [59]);
- 2) Eingriffsgrenze $\geq 12 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (siehe Literaturhinweis [44]);

ANMERKUNG Der TOC ist der gesamte Kohlenstoff in einer organischen Substanz und wird als nicht-austreibbarer organischer Kohlenstoff bestimmt.

b) Kohlenhydrat:

- 1) Warngrenze $\geq 0,9 \mu\text{g}/\text{cm}^2$;
- 2) Eingriffsgrenze $\geq 1,8 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (siehe Literaturhinweise [14], [15] und [27]);

c) Hämoglobin:

- 1) Warngrenze $\geq 1,0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (siehe Literaturhinweis [49]);
- 2) Eingriffsgrenze $\geq 2,2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (siehe Literaturhinweise [13], [14], [15] und [27]);

d) ATP:

- 1) Warngrenze $\geq 10 \text{ Femtomol ATP}/\text{cm}^2$ (siehe Literaturhinweise [17] und [62]);
- 2) Eingriffsgrenze $\geq 22 \text{ Femtomol ATP}/\text{cm}^2$ (siehe Literaturhinweise [16],[17] und [20]);

ANMERKUNG Die Umrechnung von RLU in Femtomol kann vom Lieferanten des spezifischen ATP-Überwachungsgeräts erhalten werden.

e) Endotoxin:

- 1) Warngrenze $\geq 2,2 \text{ EU}/\text{cm}^2$ (siehe Literaturhinweis [14]);
- 2) Eingriffsgrenze $\leq 20 \text{ EU}/\text{Produkt}$ (siehe Literaturhinweise [71] und [72]).

ANMERKUNG Die empfohlenen Endotoxinlevel sind $\leq 20 \text{ EU}/\text{Produkt}$ bei Implantaten und Produkten, die mit Blut in Berührung kommen, und $\leq 2,15 \text{ EU}/\text{Produkt}$ bei einem Produkt mit intrathekalem Patientenkontakt (siehe Literaturhinweise [5] und [72]).

4.4.4 Prozessrückstände

Der /die Reinigungsabschnitt(e), einschließlich jedes Spülvorgangs nach dem Reinigen, darf (dürfen) keine Prozessrückstände auf der Beladung zurücklassen, die bei nachfolgender Verwendung potenziell schädlich sind oder die nachfolgenden Prozessabschnitten beeinträchtigen (siehe 5.5).

ANMERKUNG Siehe Prozesschemikalien in ISO 15883-1:2006/Amd1:2014, 4.6.

5 Prüfung auf Übereinstimmung

5.1 Validierung von Reinigungsprüfverfahren

5.1.1 Allgemeines

Die sowohl für die Typprüfung (siehe 5.3) als auch für die Leistungsqualifizierung (siehe 5.4) angewendeten Reinigungsprüfverfahren müssen validiert werden.

ANMERKUNG 1 Das Reinigungsprüfverfahren umfasst die Prüfanschmutzung, das Anschmutzungsverfahren, das Rückgewinnungsverfahren und die Endpunktanalyse.

ANMERKUNG 2 ISO 17025 [6] fordert die Validierung von Prüfverfahren. Andere Referenzdokumente wie ASTM E 2857 [8], Arzneibücher ([67] bis [70]), ICH-Leitfäden [38] geben Anleitung zu Anforderungen für die Validierung der verschiedenen Arten von analytischen Prüfverfahren.

5.1.2 Verfahren für die Anschmutzung der Beladung

5.1.2.1 Das Verfahren für die Anschmutzung der Beladung, einschließlich seiner Anwendung und jeglicher Behandlung, muss eine zu der bzw. den ungünstigsten klinisch (worst-case) verschmutzten Beladung(en), einschließlich dem spezifizierten Beladungsträger, gleichwertige Herausforderung für die RDG-Reinigungsabschnitte simulieren (siehe 4.2.3 und 5.2.1).

5.1.2.2 Das Verfahren für die Anschmutzung der Beladung muss jegliche Konditionierung festlegen, um die Trocknung der angeschmutzten Produkte für eine festgeschriebene Zeit, Temperatur und Luftfeuchte einzubeziehen, die die Verwendung von im RDG aufbereiteten Produkten wiedergibt.

ANMERKUNG Siehe Köhnlein et al. 2008 [41] bezüglich eines Beispiels für die Konditionierung.

5.1.3 Nachweisverfahren

5.1.3.1 Das Nachweisvermögen, entweder direkt oder durch Extraktion, muss für jeden Analyten und jedes Verfahren, der/das für die Untersuchungen zur Validierung der Reinigung angewendet wird, bestimmt werden.

5.1.3.2 Die Wirksamkeit der Rückgewinnung der Prüfanschmutzung muss bestimmt und ein angemessener Korrekturfaktor angewendet werden (siehe 4.2.4).

ANMERKUNG ISO 11737-1 [2] enthält Beispiele für Verfahren zur Ermittlung der Wirksamkeit der Bioburden-Rückgewinnung und die Anwendung von Bioburden-Korrekturfaktoren. Diese Prinzipien und allgemeinen Verfahren können auch hinsichtlich der Rückgewinnung von Prüfanschmutzungen angewendet werden.

5.1.3.3 Negativ- und Positivkontrollen müssen vorgenommen werden, um Störungen des Nachweisverfahrens durch die Prozessbedingungen auszuschließen (siehe 5.2.2).

5.1.4 Verfahren für die Bestimmung des Analyten

Das gewählte Verfahren für die Bestimmung des Analyten muss für jeden im Rahmen der Untersuchungen zur Validierung der Reinigung verwendeten Analyten validiert werden.

5.2 Anforderungen an das Reinigungs-Desinfektionsgerät

5.2.1 Die Reinigungsprüfungen müssen an definierten Beladungen des Reinigungs-Desinfektionsgerätes durchgeführt werden. Die ungünstigste (worst-case) Beladung muss repräsentative Produkte und einen oder mehrere spezifizierte Beladungsträger umfassen. Jede Art von Beladungsträger mit repräsentativen Produkten muss getrennt geprüft werden, sofern keine Begründung dafür vorliegt, anderweitig vorzugehen.

5.2.2 Die Parameter des/der RDG-Reinigungsabschnitt(e) und Reinigungskemikalien müssen festgeschrieben werden. Die Typprüfung muss unter den festgeschriebenen ungünstigsten (worst-case) Parametern (z. B. Temperatur, Zeit, Konzentration der Prozesschemikalien, Betriebsmittel, Druck und Durchflussrate) durchgeführt werden.

ANMERKUNG 1 Betriebsmittel können Strom-, Wasser, Luft und Dampfversorgungen einschließen.

ANMERKUNG 2 Wenn der Betrieb des RDG unter der Verantwortung des Anwenders hinsichtlich der Leistungsqualifizierung geprüft wird, kann das RDG im Installationszustand ohne Änderung der Prozessparameter geprüft werden.

5.2.3 Die Prüfung zur Validierung der Reinigung muss ohne jeglichen Desinfektions- oder Trocknungsabschnitt erfolgen (siehe ISO 15883-1:2006/Amd1:2014, 6.10).

5.3 Typprüfung hinsichtlich Reinigung

5.3.1 Kurzbeschreibung

Zusätzlich zu den Anforderungen dieses Dokuments müssen die relevanten Reinigungsprüfanforderungen der anderen maßgeblichen Teile von ISO 15883 gelten.

5.3.2 Reagenzien/Materialien

Es müssen geronnenes Blut oder eine andere Prüfanschmutzung, wie in 4.2 definiert, verwendet werden.

5.3.3 Durchführung

5.3.3.1 Die Prüfbeladung, die Kammerwände des Reinigungs-Desinfektionsgerätes und der Beladungsträger müssen angeschmutzt werden (siehe 4.2.1 und 4.3).

ANMERKUNG 1 Hinsichtlich eines Beispiels einer Prüfanschmutzung für Beladungsträger und Kammerwände siehe Anhang A.

ANMERKUNG 2 Die für die Beladung, Kammerwand und Beladungsträger angewendete Prüfung kann unterschiedlich sein. Bei Verwendung verschiedener Prüfanschmutzungen sollte die Begründung für die Wahl der Prüfanschmutzung dokumentiert werden (siehe ISO 15883-1:2006/Amd1:2014, 6.10.2.1).

5.3.3.2 Die angeschmutzten Oberflächen müssen, wie in 5.1.2.2 beschrieben, konditioniert werden.

5.3.3.3 Die Reinigungsprüfstufen müssen unter den für das RDG definierten Prozessbedingungen dreifach durchgeführt werden (siehe 5.2.2).

5.3.4 Akzeptanzkriterien

Die Reinigungswirksamkeit muss den in 4.4.3 für die Prüfbeladung festgeschriebenen Eingriffsgrenzen entsprechen. Sofern praktikabel sollte die Reinigungswirksamkeit den Warngrenzen in 4.4.3 für die Prüfbeladung entsprechen. Für die Kammerwände und den Beladungsträger ist die Sichtprüfung möglicherweise ausreichend (siehe 4.4.2).

ANMERKUNG 1 Die Eingriffsgrenzen sind die Akzeptanzkriterien für die Reinigungswirksamkeit bei der Typprüfung, die angestrebten Kriterien sind jedoch als Warngrenzen angegeben.

ANMERKUNG 2 Fotografische Aufzeichnungen könnten bei den Sichtprüfungen behilflich sein.

5.4 Prüfung zur Leistungsqualifizierung der Reinigung

5.4.1 Kurzbeschreibung

Die Prüfung muss nach ISO 15883-1:2006/Amd1:2014, 6.10.3 und dem maßgeblichen Teil von ISO 15883 durchgeführt werden.

5.4.2 Reagenzien/Materialien

Das RDG muss mit realen, durch die klinische Anwendung kontaminierten Beladungen geprüft werden. Diese Beladungen müssen für diejenigen, die das RDG aufbereiten soll, repräsentativ sein und Produkte einschließen, die als schwierig zu reinigen gelten.

Für bestimmte Medizinprodukte dürfen Ersatzprodukte verwendet werden, die die klinischen Anwendungsbedingungen simulieren. Die Verwendung von Ersatzprodukten, Prüfanschmutzungen und Indikatoren muss hinsichtlich der Übertragbarkeit auf die klinische Anwendung validiert werden [siehe 4.1.5b)].

ANMERKUNG Ersatzprodukte können zum Nachbilden von Medizinprodukten verwendet werden, die ohne Zerstörung schwierig zu Beprobieren sind oder für die die Extraktionswirksamkeit des Probenahmeverfahrens nicht bestimmt werden kann.

5.4.3 Durchführung

5.4.3.1 Die angeschmutzten Oberflächen müssen vor der Reinigung unter Verweilzeitbedingungen gehalten werden, die für die Anwendungen im ungünstigsten (worst-case) Fall repräsentativ sind (z. B. Zeit, Temperatur und Luftfeuchte).

5.4.3.2 Die Reinigungsprüfungen müssen an vergleichbaren Beladungen dreifach vorgenommen werden (siehe 5.2).

5.4.4 Akzeptanzkriterien

Die Reinigungswirksamkeit muss den in 4.4.3 für die Prüfbeladung festgeschriebenen Eingriffsgrenzen entsprechen. Sofern praktikabel sollte die Reinigungswirksamkeit den Warn Grenzen in 4.4.3 für die Prüfbeladung entsprechen. Für die Kammerwände und den Beladungsträger ist die Sichtprüfung möglicherweise ausreichend (siehe 4.4.2).

ANMERKUNG Fotografische Aufzeichnungen könnten bei den Sichtprüfungen behilflich sein.

5.5 Prozessrückstände

5.5.1 Allgemeines

Die Begründung für diese Norm ist, dass die Risikoanalyse und die Zytotoxizitätsprüfungen Bestandteil der Typprüfung sind und das Probenahmeverfahren Bestandteil der Leistungsqualifizierung ist. Siehe ISO 15883-1:2006/Amd1:2014, Tabelle A.1.

Bei einer Änderung am Prozess müssen all diese Anforderungen erneut geprüft werden.

5.5.2 Risikoanalyse

Es muss eine Risikoanalyse dokumentiert werden, die zeigt, dass das auf Prozessrückständen beruhende Risiko auf Niveaus unterhalb schädlicher Werte verringert wurde. Die Risikoanalyse muss die Anforderungen von ISO 10993-1 berücksichtigen.

5.5.3 Betrachtungen zur Zytotoxizität

Sofern die Risikobeurteilung nichts Gegenteiliges rechtfertigt, müssen Zytotoxizitätsprüfungen nach ISO 10993-5 an Produkten, welche Teil der RDG-Beladung sind, durchgeführt werden, um das Nichtvorhandensein von potenziell schädlichen Rückständen zu belegen (siehe ISO 15883-1:2006/Amd1:2014, 4.4 und 4.6). Jede derartige Risikobeurteilung muss einen Bezug auf die Zytotoxizität der bei der Validierung eingesetzten Prozesschemikalien einschließen. Siehe [22] und [42].

ANMERKUNG Entsprechend der Risikoanalyse nach ISO 10993-1 könnten zusätzliche Biokompatibilitätsprüfungen erforderlich sein.

5.5.4 Probenahmeverfahren

Es müssen ein Probenahmeverfahren für die Extraktion von Prozessrückständen aus der Beladung und ein Analyseverfahren für den Nachweis der Prozessrückstände in den Proben spezifiziert werden. Mit diesen Verfahren muss die Bestimmung des Vorhandenseins von Prozesschemikalien in Konzentrationen unterhalb der als potenziell schädlich spezifizierten Werte, d. h. des maximal zulässigen Level, möglich sein (siehe ISO 15883-1:2006/Amd1:2014, 6.10.4). Siehe [21] und [32].

Die Probenahme muss am Ende des gesamten RDG-Prozesses erfolgen.

ANMERKUNG Rückstände könnten das Analyseverfahren stören.

Anhang A (informativ)

Beispiele für Prüfanschmutzungen

A.1 Allgemeines

In Tabelle A.1 sind Beispiele für Prüfanschmutzungen enthalten, die für die Prüfung der Reinigungswirksamkeit zur Einhaltung der Anforderungen von 4.2 verwendet werden können. Keine einzelne Prüfanschmutzung kann für die gesamte klinische Praxis als repräsentativ angesehen werden. Die Literatur deutet darauf hin, dass geronnenes Blut als ungünstigster Fall (worst-case) betrachtet werden kann und für die klinische Anwendung repräsentativ ist.

Tabelle A.1 — Beispiele zu Herstellungsverfahren für Prüfanschmutzungen

Beispiele für Verfahren	Prüfanschmutzung	Herstellung (Kurzfassung)	Verweisung
Allgemeine Chirurgie	Geronnenes Blut	0,1 ml Heparin je 100 ml Schafblut. Aufbewahrt bei 4 °C bis 8 °C und vor der Gerinnung auf Raumtemperatur gebracht. Das heparinisierte Blut wird in eine Schale gegossen, mit 0,15 ml Protaminsulfat je 10 ml Blut versetzt und gründlich durchmischt. Das Blut sollte unverzüglich eingesetzt werden und innerhalb von etwa 10 min bis 15 min gerinnen.	Wehrl, M. und Kircheis, U. [74]
Allgemeine Chirurgie	Geronnenes Blut	3,8 g Natriumcitrat je 1 000 ml frisch abgenommenem Blut (citriertes Blut). Aufbewahrt bei 4 °C bis 8 °C und vor der Gerinnung auf Raumtemperatur gebracht. Das citrierte Blut wird in eine Schale gegossen und mit 250 mmol/l CaCl ₂ versetzt, bis der Calciumionen-Gehalt in der Endlösung 2,5 mmol/l beträgt. Das Blut sollte unverzüglich eingesetzt werden und gerinnt innerhalb von etwa 10 min bis 15 min.	SIS/TR 3:2002 [66]
Allgemeine Chirurgie	Zweikomponenten-Blut-Prüfanschmutzung	<i>Komponente A:</i> 400 mg Albumin, bovin, proteasefrei; 400 mg Hämoglobin, bovin, lyophilisiert; und 60 mg Fibrinogen, bovin, lyophilisiert. <i>Komponente B:</i> 400 mg Albumin, bovin, proteasefrei; 400 mg Hämoglobin, bovin, lyophilisiert; und 12,5 NIH-Einheiten Thrombin, Reagenzqualität aus bovinem Plasma. <i>Lösungsmitteln A</i> — 5,0 ml 0,4-%-NaCl-Lösung (analysenreines NaCl gelöst in sterilem Wasser). <i>Lösungsmitteln B</i> — 5,0 ml 0,4-%-NaCl-Lösung + 8,0 mmol/l CaCl ₂ (analysenreines NaCl gelöst in sterilem Wasser). <i>Herstellung</i> — Die Komponenten A und B werden in ihren zugehörigen Lösungsmitteln A und B durch Schütteln für 1 h bei Raumtemperatur (von 20 °C bis 37 °C) in zwei verschlossenen 10-ml-Glasfläschchen gelöst.	Pfeiffer, M [57]

Beispiele für Verfahren	Prüf- anschmutzung	Herstellung (Kurzfassung)	Verweisung
Allgemeine Chirurgie, Orthopädie, obere Atemwege	Edinburgh-Anschmutzung. Defibriniertes Pferde-/Schafblut, Eigelb, dehydriertes Schweinemucin	100 ml frisches Eigelb, 10 ml defibriniertes Pferde-oder Schafblut, 2 g dehydriertes Schweinemucin zusammen vermischt. Wird sofort verwendet oder in einem luftdichten Behälter bei 2 °C bis 5 °C für höchstens eine Woche vor dem Aufbringen auf die Prüfstücke bei Raumtemperatur aufbewahrt.	HTM 01-01 [36]
Gastrointestinal	Künstliche Prüfanschmutzung (ATS 2015)	<p>Bestandteile</p> <ul style="list-style-type: none"> — Rosewell Park Memorial Institute (RPMI) 1640: 10,4 g; — hitzeinaktiviertes bovines Kälberserum: 100 ml; — (wahlweise) Rindergalle: 20 g; — steriles defibriniertes Schafblut: 20 % des Gesamtvolumens der Endlösung; — Natriumhydrogencarbonat: 2 g; — 100 mM Natriumpyruvat: 10 ml; — L-Glutamin: 10 mL von 200 mM; und — destilliertes Wasser bis zu einem Gesamtvolumen von 1 l. <p>Herstellung:</p> <p>Rindergalle, RPMI und Natriumhydrogencarbonat werden in ein Becherglas gegeben.</p> <p>Nach Zugabe von 700 ml destilliertem Wasser wird gründlich durchmischt. Anschließend werden Natriumpyruvat und L-Glutamin zugegeben und erneut gründlich durchmischt. Dieses Gemisch wird in einen Messzylinder gegossen.</p> <p>Anschließend wird destilliertes Wasser zugegeben, bis ein Gesamtvolumen von 1 l im Messzylinder erreicht ist. Das gesamte Volumen wird durch ein 0,22-µl-Membranfilter in eine sterile Flasche filtriert.</p> <p>Unter Anwendung steriler Technik wird das sterile defibrinierte Schafblut und Kälberserum zugegeben und danach gründlich durchmischt.</p>	Alfa, M.J., und Olson, N. [19]
Allgemeine Chirurgie	Blut-Prüfanschmutzung (BTS, en: Blood Test Soil)	<p>Bestandteile:</p> <ul style="list-style-type: none"> — Rinderalbumin: 0,5 gm; — Rinderhämoglobin: 1,0 gm; — Natriumalginate: 8,3 mg; — steriles Wasser für Auflösung: 27 ml; — CaCl₂-Lösung: 15 mM. <p>Herstellung:</p> <p>Die trockenen Anschmutzungsbestandteile werden in einem sterilen Behälter vermischt. Dann werden das destillierte Wasser zur Auflösung und das Calciumchlorid zugegeben und zum Homogenisieren der Anschmutzung wird gründlich durchmischt.</p> <p>Die Bestandteile der Anschmutzung vernetzen sich unter Bildung von Alginat-Hydrogelen. Diese 3D-Proteinhydrogele bilden die Fibrinhydrogele in geronnenem Blut nach.</p>	ASTM F3208-17 [9]

Beispiele für Verfahren	Prüf- anschmutzung	Herstellung (Kurzfassung)	Verweisung
Flexible Endoskopie	Biofilm-Prüf- anschmutzung	<p>Bestandteile:</p> <ul style="list-style-type: none"> — <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (CIP A22), gewachsen auf Trypton-Soja-Agar. — Das Testsystem besteht aus zwei Polytetrafluor-ethylen(PTFE)-Schlauchabschnitten von 300 mm Länge, die aus PTFE-Schlauch von 1,5 m bis 2,0 m Länge und 6 mm Innendurchmesser geschnitten wurden. <p>Herstellung:</p> <ul style="list-style-type: none"> — Der PTFE-Schlauch wird mit 5 ml bis 10 ml der Bakteriensuspension von <i>Pseudomonas aeruginosa</i>, die etwa 10^8 Bakterien je ml enthält, beimpft. — Die beiden PTFE-Schläuche werden über Absperrventile und Y-Verbindungsstücke anstelle eines Rohrabschnitts des RDG angeschlossen. — Das Testsystem wird für 72 h bis 96 h in einem Inkubator bei $(30 \pm 2) ^\circ\text{C}$ aufbewahrt. — Der Biofilm wächst auf der Schlauch-Innenoberfläche. 	Pineau et al. [60]
Toilettenhilfen	RAMS	<p>Künstlich beimpfte, in passende Produkte eingefügte Prüfgegenstände werden zum Untersuchen der physikalischen Entfernung der Prüfanschmutzung von den Produkten im RDG-Prozess verwendet. Wenn die Reinigungs- und Desinfektionswirksamkeit zu prüfen ist, kann die Prüfanschmutzung mit einem Prüforganismus beimpft werden.</p> <ul style="list-style-type: none"> — Die RAMS-Prüfanschmutzung ist ein Gemisch aus Rinderalbumin (0,6 %), Mucin (1 %) und natürlicher Maisstärke (3 %). — Wenn Vorversuche zeigten, dass <i>Enterococcus (E.) faecium</i> ATCC 6057 das resistenste Bakterium ist, dann werden diese Mikroorganismen als Prüforganismen eingesetzt. — Als Prüfgegenstände werden sterile Platten aus nicht-rostendem Stahl mit Bohrungen an jedem Ende zur Befestigung an Produkten oder Haltern, an Beladungsträgern und/oder an den Wänden des RDG verwendet. Die aufgeraute Oberfläche (etwa 100 mm × 10 mm) dient als Kontaminationsfläche. Die Prüfstücke müssen in einem RDG oder Ultraschallbad entfettet werden. — Die Prüfgegenstände werden mit RAMS oder RAMS mit einem Prüfmikroorganismus vor dem Trocken kontaminiert. — Die Prüfgegenstände werden an der Beladung und am RDG angebracht. — Die erzielte Reinheit wird visuell beurteilt, um die Reinigungswirksamkeit zu bewerten. — Die Prüfgegenstände werden auf Reinheit untersucht, um die Reinigungs- und Desinfektionswirksamkeit zu bewerten. — Die sauberen Prüfgegenstände werden in Reagenzgläser mit einem für den Prüfmikroorganismus geeigneten Wachstumsmedium überführt und die mikrobielle Reduktion wird berechnet. 	Literaturhinweise [29], [30], [43] und [73]
ANMERKUNG Die Verwendung von Prüfanschmutzungen, die Stoffe bestimmten tierischen Ursprungs enthalten, kann durch nationale Bestimmungen eingeschränkt sein.			

Anhang B (normativ)

Beurteilung der Leistung von Prüfanschmutzungen

B.1 Kurzbeschreibung

B.1.1 Prüfungsentwicklung

Das Prüfverfahren beruht auf den Prüfergebnissen, die während der Überarbeitung dieses Dokuments im Rahmen von nach einem Prüfprotokoll durchgeführten Ringversuchen erzielt wurden. Das Prüfprotokoll untersuchte vorrangig das Ablösen einer definierten Prüfanschmutzung unter definierten Temperatur- und Einwirkzeitbedingungen. Normprüfstücke (STP, en: standardized test pieces), die die ebenen Oberflächen von nichtrostendem Stahl nachahmen, wurden mit frisch geronnenem Schafblut als Prüfanschmutzung beschichtet. Die beschichteten STP wurden in eine chemisch definierte Reinigungsmittelrezeptur getaucht, um die Reinigungswirkung zu bewerten. Die Reinheit wurde durch ein definiertes Extraktions- und Proteinbestimmungsverfahren bestimmt.

B.1.2 Prüfprotokoll

Dieser Anhang legt ein Prüfprotokoll für die Bewertung von Prüfanschmutzungen unter Anwendung eines definierten Prüfverfahrens fest. Die für die Übereinstimmung mit Anhang B verwendeten Prüfanschmutzungen müssen auf Grundlage der klinischen Relevanz (siehe 4.2) gewählt werden und müssen außerdem die in B.2 festgeschriebenen Akzeptanzkriterien einhalten.

ANMERKUNG In Anhang E sind Muster von Ergebnisblättern für das Eintragen der Daten angeführt.

Die erwartete Reihenfolge der Ausführung des Protokolls ist folgende:

- a) Herstellung der Lösungen und Reagenzien;
- b) Vorbereitung der STP durch Reinigen, Beschichten mit Prüfanschmutzung, Konditionieren, Schneiden und Wägen;
- c) UV-VIS-Analyse der Kontrolllösungen;
- d) Herstellung der BSA-Standardlösungen und Erstellung der Kalibrierkurve;
- e) UV-VIS-Analyse der Negativkontroll-STP;
- f) UV-VIS-Analyse der Positivkontroll-STP;
- g) Prüfung durch Eintauchen, Extraktion, Elution und Analysis der aufbereiteten STP;
- h) abschließende Reinigung sämtlicher aufbereiteter STP.

B.2 Akzeptanzkriterien

Bei der Auswahl einer Prüfanschmutzung (siehe 4.2.2) muss die Prüfanschmutzung bei Prüfung nach den Anforderungen dieses Anhangs Folgendes erfüllen:

Prüfbedingung	Dauer	Verbliebene Restanschmutzung
Wasser, 25 °C	30 s	Muss gleich oder mehr als 12 % verbliebenes Protein sein
Wasser, 25 °C	90 s	Muss gleich oder mehr als 2 % verbliebenes Protein sein
Wasser, 75 °C	30 s	Muss gleich oder mehr als 12 % verbliebenes Protein sein
Wasser, 75 °C	90 s	Muss gleich oder mehr als 6 % verbliebenes Protein sein

B.3 STP-Vorbereitung

- 1.
- 2.
- 3.

B.3.1 Allgemeines

B.3.1.1 Erforderliche STP-Anzahl

Für die Prüfung werden insgesamt 12 STP benötigt. Diese setzen sich zusammen aus:

- a) 8 beschichteten STP – 2 Prüfungen in gereinigtem Wasser bei zwei Temperaturen und Zeitpunkten mit zwei Wiederholungen für jede Prüfbedingung;
- b) 2 beschichteten STP – Positivkontrolle;
- c) 2 unbeschichteten STP – Negativkontrolle.

Zusätzlich werden 2 unbeschichtete STP für Negativkontrollen benötigt.

B.3.1.2 Material und Größe

Die STP bestehen aus 0,127 mm dicker Folie aus gehärtetem nichtrostendem Stahl 316L. Die Endgröße ist 50 mm × 50 mm.

B.3.2 Herstellung der Prüfstücke aus nichtrostendem Stahl

Die Folie aus nichtrostendem Stahl muss in Streifen von 220 mm bis 250 mm Länge und 200 mm Breite geschnitten, gereinigt, mit Hilfe eines Mayer-Stabs Nr. 5 mit der Prüfanschmutzung beschichtet und getrocknet werden. Die nichtrostende Stahlfolie wird anschließend aus der Folienmitte in die zur Prüfung eingesetzten STP von 50 mm × 50 mm (mit 25 mm Rand auf jeder Seite als Abfall oder zur Handhabung) geschnitten und dann konditioniert. Die STP dürfen nur einmal verwendet werden und alle für eine Versuchsreihe benötigten STP müssen zur gleichen Zeit hergestellt werden.

B.3.2.1 Vorbereitung der Oberfläche der nichtrostenden Stahlfolie

3.1

3.2

3.2.1

B.3.2.1.1 Die etwa 220 mm bis 250 mm langen und 200 mm breiten Streifen der nichtrostenden Stahlfolie müssen vor dem Auftragen der Prüfanschmutzung gereinigt und auf Proteinfreiheit geprüft werden.

B.3.2.1.2 Zur Identifizierung muss die Rückseite der nichtrostenden Stahlfolie vor der Reinigung durch Ritzen (Anreißen) mittels Reißnadel nummeriert und in 50 mm × 50 mm große STP eingeteilt werden, wie in Bild B.1 dargestellt.

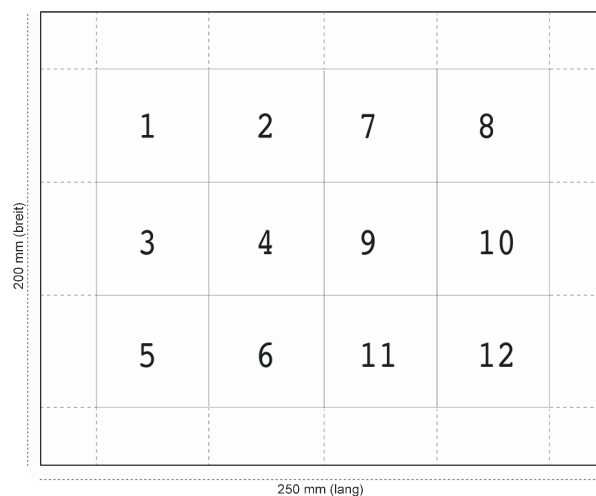


Bild B.1 — Nichtrostende Stahlfolie, auf etwa 250 mm × 200 mm geschnitten und zur Identifizierung auf einer Seite mittels Reißnadel gekennzeichnet

B.3.2.2 Reinigung der nichtrostenden Stahlfolie

Die angerissene nichtrostende Stahlfolie und sämtliche direkt damit einhergehenden Geräte müssen nach folgendem Verfahren gereinigt werden. Tabelle B.1 enthält eine Liste der zu reinigenden Geräte, und Tabelle B.2 gibt die Chemikalien an, die für die Durchführung der Reinigung erforderlich sind.

Tabelle B.1 — Zu reinigende Geräte

Gerät	Einzelheiten	Lieferant	Zweck
Folie aus gehärtetem nichtrostenden Stahl (250 mm × 200 mm)	Nach EN 10088-2, 1.4404 Oberflächengüte 2R	UK Supplier: Knight Strip Metals Ltd (www.knight-group.co.uk) Code: Annealed 1.4404 ((200,0 × 0,127) mm, 2R surface finish)	Trägermaterial für STP
Lineal aus nichtrostendem Stahl	300 mm lang	N/A	Zum Kennzeichnen der STP
Reißnadel	N/A	N/A	Zum Anreißen der nichtrostenden Stahlfolie

Gerät	Einzelheiten	Lieferant	Zweck
Scheren	Schneiderscheren	Faithfull Tools, Stock No. FAI SCTS8, 200 mm size, Long Reach, Galleon Boulevard, Crossways Business Park, Dartford, Kent DA2 6QE, UK, http://www.faithfulltools.com/p/Tailor_Shears	Zum Schneiden der STP
Lange Zange (Pinzette)	Nichtrostender Stahl (230 mm bis 270 mm lang)	N/A	Zum Halten der STP bei der Prüfung
Pinzetten	Nichtrostender Stahl	N/A	Zum Handhaben der STP
Drahtumwickelter Rollraket	Nr. 5 (K-Auftraggerät, hornfarben) Mindestens 250 mm lang <u>Enge Wicklung:</u> Drahtdurchmesser = 0,64 mm (0,025 Zoll) Nassfilmauftrag = 50 µm (0,002 0 Zoll)	K Print Coat Instrument Ltd, Litlington, Royston, Herts, SG8 0QZ, UK	Zum Auftragen der Prüfanschmutzung auf die nichtrostende Stahlfolie
PVC-Saugnapfhalter	Saugnapfhalter mit 40 mm Durchmesser und Knopf	www.rubbersuckers.co.uk http://suctioncupsuk.com	Zum Anbringen des STP an der langen Zange

Tabelle B.2 — Erforderliche Chemikalien für die Reinigung der nichtrostenden Stahlfolie und zugehörigen Geräte

Chemikalien	Reinheitsgrad	CAS-Nr.	Lieferant
Decon 90®	—	—	VWR Merck; Kat-Nr. 148-0324 Kat-Nr. 148-0325
Isopropanol	70 % technisch	67-63-0	Fisher, Sigma Aldrich, VWR Merck
Wasser	gereinigt	151-21-3	—

B.3.2.3 Durchführung

Die Reinigung der nichtrostenden Stahlfolie wird getrennt von den Geräten nach dem gleichen Verfahren wie folgt durchgeführt:

- Die zu reinigende(n) nichtrostende Stahlfolie/Geräte werden in einen Kunststoffbehälter geeigneter Größe gelegt.
- in einem großen Becherglas wird eine ausreichende Menge Decon-90®Reinigungslösung von 5 % (m/m) hergestellt.
- Die Lösung wird unter Rühren auf 45 °C bis 50 °C erwärmt.
- Die erwärmte Lösung wird in den Behälter gegeben, wobei sicherzustellen ist, dass sämtliche Geräte vollständig eingetaucht sind.

- e) Der Behälter wird unter gelegentlichem Schwenken für 10 min stehen gelassen.
- f) Die Reinigungsmittellösung wird dekantiert.
- g) Die Geräte werden unter stetigem Schwenken zweimal mit gereinigtem Wasser gespült, um sicherzustellen, dass sämtliches Reinigungsmittel von den Geräten entfernt wird.
- h) Die Geräte werden zum schnelleren Trocknen mit Isopropanol gespült.
- i) Die gereinigten Geräte werden sorgfältig entnommen und in eine geeignete proteinfreie Umgebung überführt.

B.3.3 Beschichten der STP

B.3.3.1 Vorkehrungen

Es müssen Vorkehrungen getroffen werden, um sicherzustellen, dass nur auf der definierten Fläche der nicht angerissenen Seite der nichtrostenden Stahlfolie eine definierte Masse der Prüfanschmutzung aufgetragen wird, damit die angerissene Seite nicht beschichtet wird und sichergestellt ist, dass keine Prüfanschmutzung über die Folienränder fließt.

B.3.3.2 Durchführung

Zum Beschichten der nichtrostenden Stahlfolie wird wie folgt vorgefahren:

- a) Es wird sichergestellt, dass frisch hergestellte Prüfanschmutzung verwendet wird.
- b) Die nichtrostende Stahlfolie wird mit der nicht angerissenen Seite nach unten auf eine rutschfeste proteinfreie Oberfläche gelegt.
- c) Etwa 5 ml der Prüfanschmutzung werden gleichmäßig über ein Ende der nichtrostenden Stahlfolie (nicht angerissene Seite) aufgetragen (siehe Bild B.2) ohne über die Ränder hinaus zu beschichten.
- d) Die Prüfanschmutzung wird mit einem Mayer-Stab Nr. 5 (K-Auftraggerät) unter stetigem und gleichmäßigem Andruck verteilt.
- e) Die bestrichene nichtrostende Stahlfolie wird zum Trocknen für mindestens 2 Stunden bei 20 °C bis 25 °C (Raumtemperatur) liegen gelassen.
- f) Mit einer sauberen Schere wird die bestrichene nichtrostende Stahlfolie sorgfältig in die einzelnen STP (etwa 50 mm × 50 mm, wie in B.3.2.1.2 beschrieben) geschnitten. Es wird entlang der angerissenen Linien (auf der Rückseite) geschnitten, unter Vermeidung die beschichtete Seite zu kontaminieren.
- g) Die einzelnen STP werden bei 20 °C bis 25 °C und 40 % bis 60 % relativer Feuchte (RF) für (24 ± 2) h unter geregelten Bedingungen konditioniert (siehe B.3.5).
- h) Die STP werden sichtgeprüft und alle nicht vollständig beschichteten werden verworfen.
- i) Alle STP werden auf einer vierstelligen Laboranalysenwaage gewogen, und die jeweilige Masse wird aufgezeichnet [siehe Tabelle E.4 (Positivkontrollen) und Tabelle E.5 (Tauch-STP)].

ANMERKUNG Zum Wägen und Aufbewahren der STP können saubere Kunststoff-Petrischalen für den Einmalgebrauch oder ähnliche Gefäße verwendet werden, mit denen sichergestellt wird, dass die mit Prüfanschmutzung bestrichene Seite oben bleibt, um Proteinkontamination der STP-Rückseite zu verhindern, und dass die STP vor der Verwendung bedeckt sind.

- j) Die beschichteten und gewogenen STP werden innerhalb von 24 Stunden nach der Konditionierung verwendet, wobei sicherzustellen ist, dass sie unter diesen Bedingungen verbleiben, solange sie nicht eingesetzt werden.
- k) Bei Transport und vor der Anwendung werden die STP im bedeckten Zustand aufbewahrt.

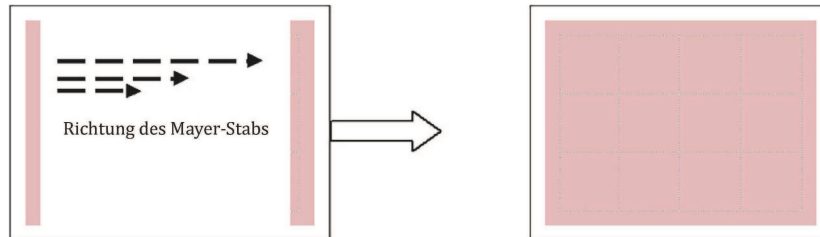


Bild B.2 — Beschichtete Seite nach oben

B.3.4 STP für Negativkontrollen

B.3.4.1 Durchführung

Die STP für Negativkontrollen werden wie folgt hergestellt:

- a) Auf einem Stück nichtrostender Stahlfolie werden mittels Reißnadel zwei STP von 50 mm × 50 mm angerissen und als N1 und N2 gekennzeichnet. Die einzelnen STP werden ausgeschnitten und gereinigt (siehe B.3.2.3).
- b) Die einzelnen STP werden auf einer vierstelligen Laboranalysenwaage gewogen, und die jeweilige Masse wird aufgezeichnet (siehe Tabelle E.3).

ANMERKUNG Zum Wägen und Aufbewahren der geschnittenen STP können saubere Kunststoff-Petrischalen für den Einmalgebrauch oder ähnliche Gefäße verwendet werden, um Proteinkontamination der STP zu verhindern.

B.3.5 STP-Konditionierung

B.3.5.1 Allgemeines

Die beschichteten STP werden nach folgender Verfahrensweise bei 20 °C bis 25 °C und 40 % bis 60 % relativer Feuchte (RF) konditioniert. Die Geräte und Reagenzien für die Konditionierung müssen mindestens 2 Stunden vor dem Auftragen der Prüfanschmutzung auf die nichtrostende Stahlfolie vorbereitet werden.

B.3.5.2 Durchführung

Die STP werden wie folgt konditioniert:

- a) Unter Verwendung eines Exsikkators geeigneter Größe oder einer luftdichten Kammer wird zu 100 ml Wasser in einem Gefäß geeigneter Größe unter Rühren eine ausreichende Menge Magnesiumnitrat (MgNO_3) gegeben, um eine gesättigte Lösung zu erhalten, wobei sicherzustellen ist, dass ungelöstes Magnesiumnitrat im Gefäß verbleibt.
- b) Die gesättigte Lösung wird in ein größeres Gefäß oder größeren Behälter (z. B. große Petrischale) überführt und auf den Boden des Exsikkators oder der Kammer gestellt.
- c) Der Exsikkator/die Kammer wird gesichert und geschlossen, damit Luftdichtheit sichergestellt ist.
- d) Zur Stabilisierung der relativen Feuchte sind mindestens 2 Stunden einzuräumen.

B.4 Prüfeinrichtung für die Tauchprüfung

B.4.1 Allgemeines

Die Geräte und das Zubehör, die zur Durchführung der Tauchprüfung erforderlich sind, sind nachfolgend angeführt und in Bild B.3 dargestellt.

B.4.2 Prüfeinrichtung

- a) Magnet-Heizrührer mit fester Geschwindigkeitseinstellung (50 min^{-1}).
- b) Magnetrührstab mit 25 mm Länge und 6 mm Durchmesser.
- c) gereinigtes Wasser.
- d) Becherglas (400 ml niedrige Form, 80 mm Durchmesser).
- e) Temperaturmesssystem [(0 bis 100) °C $\pm 0,5$ °C] für Becherglas.
- f) Stativ, Stativklammern und Vorrichtung zum Halten des PVC-Saugnapfes, der Klemme und des STP in ihren Positionen zu halten, ohne direkten Kontakt mit der beschichteten Fläche zuzulassen.
- g) Stoppuhr.
- h) Proteinfreie lange Zange.

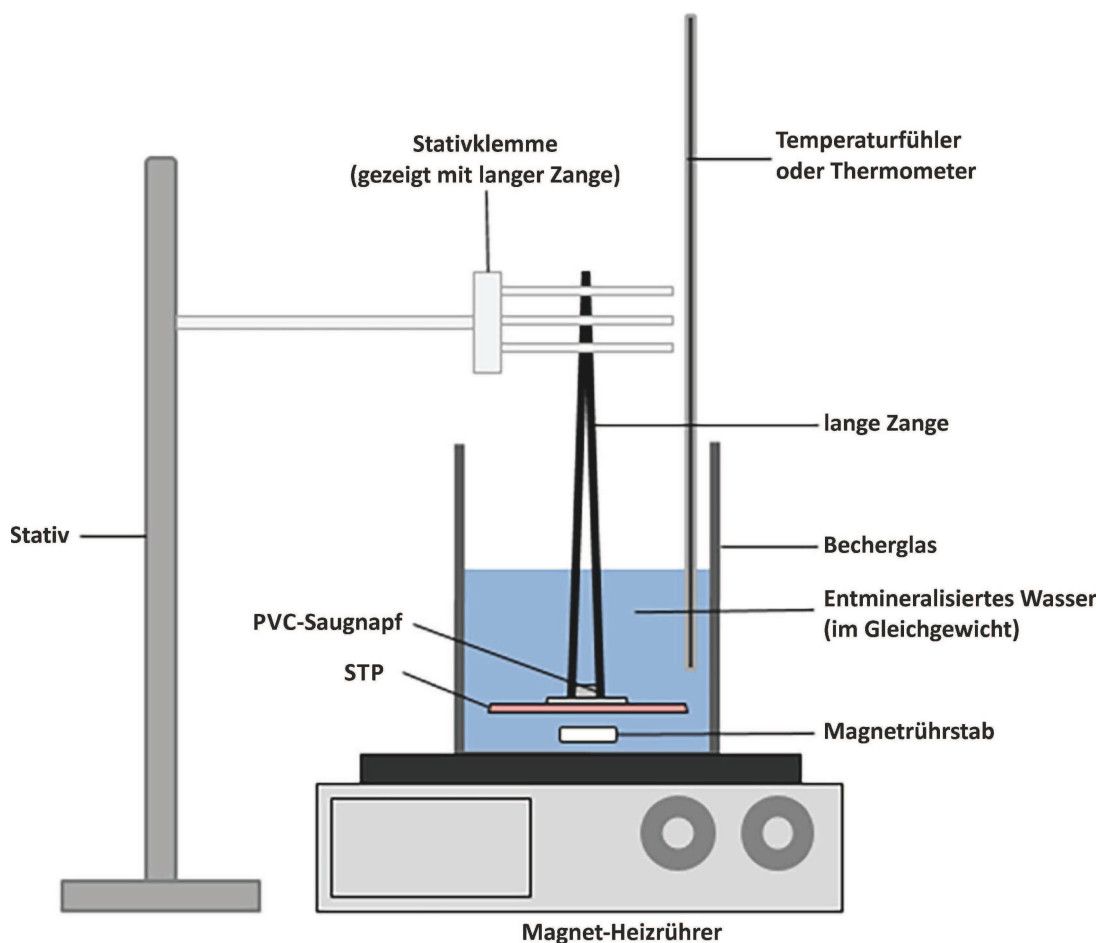


Bild B.3 — Prüfeinrichtung für die Tauchprüfung

B.5 Tauchprüfverfahren

B.5.1 Allgemeines

Das Tauchprüfverfahren ist bei 2 Temperaturen, $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ und $(75 \pm 2)^\circ\text{C}$, und zwei Zeitintervallen, 30 s und 90 s, durchzuführen.

B.5.2 Durchführung

Für die Tauchprüfung wird wie folgt verfahren:

- In das 400-ml-Becherglas werden 100 ml gereinigtem Wasser gegeben. Die Rührgeschwindigkeit wird auf 50 min^{-1} eingestellt.
- Es wird sichergestellt, dass die Temperatur im Becherglas der gewünschten Prüftemperatur mit einer Grenzabweichung von $\pm 2^\circ\text{C}$ entspricht.
- Das STP wird mit der bestrichenen Seite nach unten auf eine geeignete saubere und proteinfreie Oberfläche gelegt und ein 40-mm-PVC-Saugnapf auf der nicht bestrichenen Seite angebracht und die lange Zange am PVC-Saugnapf fixiert (siehe Bild B.4).
- Das STP wird in waagerechter Ausrichtung so tief in das gereinigte Wasser im Becherglas gehängt (siehe Bild B.3), dass es vollständig eingetaucht ist (etwa 10 mm bis 15 mm), aber den Magnetrührstab nicht berührt, worauf die Stoppuhr gestartet wird.

ANMERKUNG Es kann notwendig sein, den Rührer vor dem Eintauchen des STP vorübergehend auszuschalten, um Luftblasenbildung auf der Oberfläche der bestrichenen STP-Seite zu verhindern.

- Nach der festgeschriebenen Tauchzeit wird der Rührer ausgeschaltet, das eingeklemmte STP entnommen und die wässrige Prüflösung vorsichtig abgeschüttelt.
- Während das STP noch am PVC-Saugnapf angebracht und die lange Zange fixiert ist, wird eine Seite des STP für 30 s auf ein Stück saugfähiges proteinfreies Papier gelegt (siehe Bild B.5).
- Über dem 500-ml-Becherglas, das die Elutionslösung und Glasperlen entsprechend der Vorbereitung nach B.6.2 enthält, wird mittels proteinfreier Pinzette an der Lösevorrichtung (Belüftungsglasche) am Rand des Saugnapfes gezogen und das STP in die Elutionslösung fallen gelassen (siehe Bild B.6).

ANMERKUNG Das Elutionsverfahren wird in B.6.2 weiter beschrieben.

- Die Tauchprüfung wird für insgesamt 2 Wiederholbestimmungen je Tauchtemperatur und Tauchdauer wiederholt.



Bild B.4 — Anbringen der langen Zange und des Saugnapfs am STP

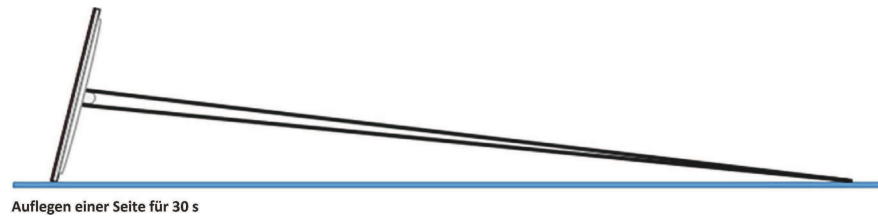


Bild B.5 — Ablegen des STP nach dem Eintauchen

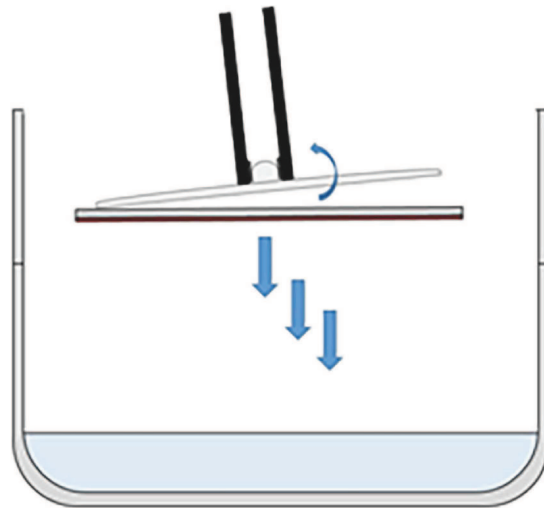


Bild B.6 — Einbringen des STP in die Elutionslösung

B.6 STP-Elutionsverfahren

B.6.1 Allgemeines

Beim Elutionsverfahren wird die restliche, Protein enthaltende Prüfanschmutzung in der Elutionslösung extrahiert, in der sie anschließend mittels OPA-Reagenzien durch UV-VIS-Spektroskopie analysiert wird.

Zur Vermeidung von Proteinkontamination sollten proteinfreie Nicht-Latexhandschuhe getragen werden.

B.6.2 Durchführung

Für die Elution des Restproteins aus STP wird wie folgt verfahren:

- 10 ml der Elutionslösung [SDS-Lösung von 1 % (m/V), siehe B.12.2] werden in ein 500-ml-Becherglas gegeben.
- In das Becherglas werden 2,0 g 200 Micron bis 400 Micron Glasperlen gegeben.
- Nach dem Einbringen des STP in die Elutionslösung [siehe B.5.2 g)] wird das Becherglas zur Minimierung der Verdunstung abgedeckt.
- Auf einem Orbitalschüttler wird 20 min bis 30 min bei 20 °C bis 25 °C geschüttelt.
- Nach dem Schütteln wird das STP mit einer proteinfreien Pinzette entnommen, wobei sichergestellt wird, dass die Glasperlen im Becherglas bleiben. Das STP wird auf ein saugfähiges proteinfreies Tuch gelegt. Das STP wird für die gravimetrische Bestimmung der Masse der aufgetragenen Schicht auf dem STP behalten (siehe B.10).

- f) Die eluierte Lösung wird stehen gelassen, bis sich die Glasperlen auf dem Boden des Becherglases abgesetzt haben. Die Elutionslösung wird sorgfältig in ein Fläschchen (z. B. Szintillationsfläschchen) dekantiert oder pipettiert und dieses mit einer Kappe verschlossen, wobei sichergestellt wird, dass die Glasperlen im Becherglas bleiben. Das Fläschchen wird der STP-Nummer und den Prüfbedingungen gekennzeichnet, z. B. STP Nr. 1, 25 °C, 30 s, Wiederholung 1.
- g) Die Elutionslösung wird mittels UV-VIS-OPA-Verfahren (siehe B.9) analysiert.

B.7 UV-VIS-OPA-Verfahren

B.7.1 Allgemeines

Der Restproteingehalt in der Elutionslösung muss durch quantitative Proteinbestimmung durch UV-VIS-Spektralphotometrie unmittelbar nach der Extraktion mittels OPA-Verfahren bestimmt werden. Das Verfahren muss angewendet werden, um Messwerte für die UV-VIS-Absorption zu erhalten. Für das Verfahren werden Kalibrierkurven und UV-VIS-Standards/-Vergleichsproben benötigt.

B.7.2 Geräte

Für die Durchführung der UV-VIS-Analyse sind folgende Geräte und folgendes Zubehör erforderlich:

- a) UV-VIS-Spektrometer, eingestellt auf eine Wellenlänge von 340 nm;
- b) kalibrierte einstellbare Pipette;
- c) Pipette für den Einmalgebrauch;
- d) Quarzküvetten desselben Typs und derselben Marke;
- e) geeignete Laborglasgeräte (z. B. Bechergläser, Messkolben usw.).

B.7.3 Kalibrierkurven

Für die quantitative Bestimmung der komplexen Proteinproben muss die Proteinkonzentration in der Prüfanschmutzung im Vergleich zu einem Referenz- oder Modellprotein, das der bovinen Serumalbumin(BSA)-Fraktion V gleichwertig ist, bewertet werden. Dies erlaubt die quantitative Bestimmung des Proteins auf den STP mit Hilfe einer BSA-Kalibrierkurve.

ANMERKUNG Die bei der quantitativen Bestimmung erhaltenen Werte sind lediglich Indikatoren für den Proteingehalt, da sie als BSA-Äquivalente ausgedrückt werden. Dies könnte dazu führen, dass das Gewicht des ermittelten Proteingehaltes größer ist als das Gewicht der aufgetragenen Prüfanschmutzung.

B.7.4 Herstellung der BSA-Stammlösung

B.7.4.1 Allgemeines

Die BSA-Kalibrierkurve muss zum Bestimmen des Proteingehalts auf den STP verwendet werden. Die benötigten Stoffe sind Tabelle B.3 angeführt und werden zum Herstellen verdünnter Proben für die Kalibrierkurve verwendet.

Tabelle B.3 — Erforderliche Chemikalien für die BSA-Stammlösung

Reagens	Reinheitsgrad	CAS-Nr.
Bovines Serumalbumin (BSA), Fraktion V (BSA), fest	> 98 %	9048-46-8
1 % (m/V) SDS-Lösung (hergestellt in B.12.2)	—	—

B.7.4.2 Durchführung

Die BSA-Stammlösung wird wie folgt hergestellt:

- (100 ± 0,1) mg festes BSA werden abgewogen, die Masse aufgezeichnet und in einen 100-ml-Messkolben gegeben.
- Der Kolben, der das feste BSA enthält, wird unter vorsichtigem Rühren mit der SDS-Lösung von 1 % (m/V) bis 100-ml-Marke aufgefüllt. Dabei wird sichergestellt, dass sich das BSA vollständig löst. Die Konzentration der Lösung beträgt 1,0 mg/ml (1 000 µg/ml).

Diese Stammlösung wird zum Herstellen sämtlicher Folgeverdünnungen für die Erstellung der BSA-Kalibrierkurve verwendet. Die Stammlösung sollte unmittelbar nach der Herstellung verwendet werden.

- Aus der BSA-Stammlösung werden mit kalibrierten Pipetten Verdünnungen hergestellt, so dass ein anfänglicher Konzentrationsbereich von 2,5 µg/ml bis 800 µg/ml abgedeckt wird (siehe Tabelle E.2), wobei die SDS-Lösung von 1 % (m/V) als Verdünnungsmittel dient.

Die Konzentration sollte 800 µl/ml (+20 µl/ml) nicht überschreiten, um die Linearität der Kalibrierkurve beizubehalten.

- Die Verdünnungen müssen bei 20 °C bis 25 °C (Raumtemperatur) unter Ausschluss von Licht aufbewahrt werden, wenn sie nicht in Gebrauch sind.

B.7.5 UV-VIS-System und Reagenzienverträglichkeit für das OPA-Verfahren

B.7.5.1 Allgemeines

Vor der Analyse ist es notwendig, zu bestimmen, ob die Reagenzien und Verdünnungen für die Verwendung geeignet sind, um fehlerhafte Ergebnisse zu minimieren. Es gibt vier (4) Kontrollen, die für die Bestimmung verwendet werden müssen, ob die Geräte (Spektrometer und Küvetten) akzeptabel sind, und zwei (2) Reagenzienkontrollen zur Bestimmung, ob die bei der Prüfung erhaltenen Absorptionswerte zuverlässig sind. Dies stellt sicher, dass:

- die verwendeten Verdünnungsmittel akzeptabel sind (nicht zersetzt);
- die gemessene Absorption für Berechnungen normalisiert ist, wobei die Absorptionswerte von den Reagenzien und Verdünnungsmitteln, die zur Probenherstellung verwendet wurden, berücksichtigen werden.

B.7.5.2 Kontrollen für die Systemeignung

B.7.5.2.1 Die vier Systemeignungskontrollen müssen vor und nach dem Einsatz des UV-VIS-Spektrometers für die Analyse durchgeführt werden. Die Kontrollen sind in Tabelle B.4 zusammen mit dem Verfahren und den typischen Absorptionswerten angegeben.

Tabelle B.4 — Systemeignungsprüfungen

Kontrolle	Verfahren
Luft	<ul style="list-style-type: none"> — Aufnahme von drei Messwerten des UV-VIS-Spektrometers (bei 340 nm) ohne Küvette im Messgerät. Am Messgerät darf weder vor noch nach jeder Ablesung eine Null(punkt)einstellung vorgenommen werden. Dies ist die Basislinien-Nullpunkt-Probe. Wenn die erhaltenen Werte nicht zwischen –0,001 und 0,001 liegen, muss eine automatische Nullpunktkorrektur vorgenommen werden. Küvetten können in einigen Fällen Ablesewerte > 0,001 ergeben. — Jegliche Absorption durch eine Küvette hebt sich bei Verwendung für nachfolgende Analysen durch Kürzen auf, wenn die Probenberechnungen durchgeführt werden. — Typische Absorption: –0,001 bis 0,001 (oder 0,000 bei automatischer Nullpunktkorrektur)
SDS-Lösung von 1 % (m/V) (hergestellt in B.12.2)	<ul style="list-style-type: none"> — Eine Küvette wird nur mit der SDS-Lösung von 1 % (m/V) gefüllt, und von der Lösung werden drei Messwerte genommen. — Typische Absorption: 0,03 bis 0,05
SDS-Borat-Lösung (hergestellt in B.12.6)	<ul style="list-style-type: none"> — Eine Küvette wird nur mit der SDS-Borat-Lösung gefüllt, und von der Lösung werden drei Messwerte genommen. — Typische Absorption: 0,03 bis 0,05
OPA-Reagens (hergestellt in B.12.7)	<ul style="list-style-type: none"> — Eine Küvette wird nur mit dem OPA-Reagens gefüllt, und von der Lösung werden drei Messwerte genommen. — Typische Absorption: 0,09 bis 0,11, muss ≤ 0,15 sein

B.7.5.2.2 Für jede Kontrolle werden 3 Werte genommen, bevor die BSA-Kalibrierkurve erstellt wird (siehe B.7.6), und der Mittelwert aufgezeichnet (siehe Tabelle E.1).

Es gilt als normale Praxis, die gleiche Küvette für die Systemeignungs- und Reagenzienkontrollen zu verwenden (B.7.5.3). Wenn dies jedoch nicht praktikabel ist, sollten Maßnahmen getroffen werden, um Uneinheitlichkeiten innerhalb der Küvette und Abweichungen zwischen Küvetten zu vermeiden.

B.7.5.2.3 Die Küvette muss vor jeder spektralphotometrischen Analyse zweimal mit der SDS-Lösung von 1 % (m/V) gespült werden.

B.7.5.3 Reagenzienkontrollen

B.7.5.3.1 Die beiden Reagenzienkontrollen müssen vor und nach dem Einsatz des UV-VIS-Spektrometers für die Analyse durchgeführt werden. Die Kontrollen sind in Tabelle B.5 zusammen mit dem Verfahren und den typischen Absorptionswerten angegeben.

Tabelle B.5 — Reagenzienkontrollprüfungen

Reagenzienkontrolle	Verfahren
Reagenzienkontrolle A	<ul style="list-style-type: none"> — Eine Küvette wird mit Hilfe einer kalibrierten automatischen Pipette mit gleichen Volumina der SDS-Lösung von 1 % (m/V) und der SDS-Borat-Lösung [Verhältnis 1 : 1 (V/V)] gefüllt. Der Küvetteninhalt wird mit einer Pipette für den Einmalgebrauch durchmischt. — Die Küvette wird für 60 s bis 90 s stehen gelassen und anschließend werden drei Messwerte bei 340 nm abgelesen. — Typische Absorption: 0,03 bis 0,05
Reagenzienkontrolle B	<ul style="list-style-type: none"> — Eine Küvette wird mit Hilfe einer kalibrierten automatischen Pipette mit gleichen Volumina der SDS-Lösung von 1 % (m/V) und der OPA-Lösung [Verhältnis 1 : 1 (V/V)] gefüllt. Der Küvetteninhalt wird mit einer Pipette für den Einmalgebrauch durchmischt. — Die Küvette wird für 60 s bis 90 s stehen gelassen und anschließend werden drei Messwerte bei 340 nm abgelesen. — Typische Absorption: 0,06 bis 0,09

B.7.5.3.2 Für beide Kontrollen werden drei (3) Werte genommen, bevor die BSA-Kalibrierkurve erstellt wird (siehe B.7.6), und der wird Mittelwert aufgezeichnet (siehe Tabelle E.1).

B.7.5.3.3 Die Küvette muss vor jeder spektralphotometrischen Analyse zweimal mit der SDS-Lösung von 1 % (m/V) gespült werden.

ANMERKUNG Wenn die Absorption der Lösung der Reagenzienkontrolle A bei derselben Messreihe größer als die Absorption der Lösung der Reagenzienkontrolle B ist, müssen die Lösungen neu hergestellt werden.

B.7.6 Erstellen einer BSA-Kalibrierkurve

Das folgende Verfahren gilt für ein Küvetten-Nennvolumen von 3,0 ml. Bei einer Küvette, deren Nennvolumen kleiner oder größer als dieser Wert ist, werden die Volumina entsprechend angepasst. Von der Probe und dem Verdünnungsmittel werden gleiche Volumina eingesetzt [Mischungsverhältnis 1 : 1 (V/V)]. Mehrere Küvetten zur Bestimmung der Probenabsorptionen sind zulässig, vorausgesetzt, alle verwendeten Küvetten für das eingesetzte Reagens ergeben eine ähnliche Absorbierung.

Die Nachweisgrenze muss die für die Reagenzienkontrolle A erhaltene Absorbierung sein (siehe B.7.5.3).

B.7.6.1 Verfahren zur Probenvorbereitung und UV-Datenerfassung

Die Proben werden für die Datenerfassung wie folgt vorbereitet:

- Vor der Fortsetzung wird sichergestellt, dass die Systemeignungskontrollen (siehe B.7.5.2) und Reagenzienkontrollen (siehe B.7.5.3) am gleichen Tag durchgeführt wurden.

Am Spektrometer darf zu keinem Zeitpunkt eine automatische Nullpunktkorrektur vorgenommen werden.

- Mit einer kalibrierten automatischen Pipette werden gleiche Volumina der Reagenzienkontrolle A und der hergestellten, zu untersuchenden BSA-Verdünnung (z. B. 1,50 ml Reagenzienkontrolle A und 1,50 ml BSA-Verdünnung) in die Küvette gegeben.
- Der Küvetteninhalt wird mit einer Pipette für den Einmalgebrauch durchmischt. Es sollte darauf geachtet werden, die Bildung von Luftblasen auf ein Mindestmaß zu verringern, da diese die Messung mit dem Spektrometer stören können.

- d) Die Küvette wird für 60 s bis 90 s stehen gelassen, worauf sicherzustellen ist, dass die Probe nicht trüb ist.
- e) Die Küvette wird in das UV-VIS-Spektrometer eingesetzt, und es werden drei Messwerte von der Lösung genommen. Der Mittelwert wird aufgezeichnet (siehe Tabelle E.2).

ANMERKUNG Die erhaltene Absorption entspricht der für BSA-Probe/Eigenabsorption bei der Konzentration der verwendeten Verdünnungsstufe.

- f) Die Küvette wird entnommen und der Inhalt verworfen, worauf zweimal mit der SDS-Lösung von 1 % (m/V) gespült wird.
- g) Mit einer kalibrierten automatischen Pipette werden gleiche Volumina des OPA-Reagens und der hergestellten, zu untersuchenden BSA-Verdünnung (z. B. 1,50 ml OPA-Reagens und 1,50 ml BSA-Verdünnung) in die Küvette gegeben.
- h) Der Küvetteninhalt wird mit einer Pipette für den Einmalgebrauch durchmischt. Es sollte darauf geachtet werden, die Bildung von Luftblasen auf ein Mindestmaß zu verringern, da diese die Messung mit dem Spektrometer stören können.
- i) Die Küvette wird für 60 s bis 90 s stehen gelassen, worauf sicherzustellen ist, dass die Probe nicht trüb ist.
- j) Die Küvette wird in das UV-VIS-Spektrometer eingesetzt, und es werden drei Messwerte von der Lösung genommen. Der Mittelwert wird aufgezeichnet (siehe Tabelle E.2).

ANMERKUNG Die erhaltene Absorption entspricht der für BSA-Probe/OPA-Reagens bei der Konzentration der verwendeten Verdünnungsstufe.

- k) Die Küvette wird entnommen und der Inhalt verworfen, worauf zweimal mit der SDS-Lösung von 1 % (m/V) gespült wird.
- l) B.7.6.1 b) bis B.7.6.1 k) werden für alle hergestellten BSA-Verdünnungen wiederholt, um den Bereich von 2,5 µg/ml bis 800 µg/ml abzudecken.

ANMERKUNG Die Konzentration der Probe der BSA-Lösung (BSA-Anfangskonzentration) wird bei der Verdünnung mit der gleichen Menge Verdünnungsmittel in der Küvette faktisch halbiert (als normalisierte BSA-Konzentration bezeichnet).

B.7.6.2 Korrigierte normalisierte mittlere Probenabsorptionen (${}^NE_{BSA}$)

Für jede verwendete BSA-Verdünnungsprobe (n) wird die jeweilige mittlere Absorption berechnet und anschließend durch Subtraktion normalisiert, wofür die Reagenzienkontrollen eingesetzt werden (siehe Tabelle E.2).

- a) Normalisierte BSA-Probe/Eigenabsorption (${}^{SA}E_n$) = Absorptions-Mittelwert – Mittelwert der Reagenzienkontrolle A
- b) Normalisierte BSA-Probe/OPA-Reagens (${}^{OPA}E_n$) = Absorptions-Mittelwert – Mittelwert der Reagenzienkontrolle B
- c) Korrigierte normalisierte mittlere Probenabsorption: ${}^NE_n = {}^{OPA}E_n - {}^{SA}E_n$

Dabei ist n die BSA-Anfangskonzentration in spezifizierten µg/ml für die untersuchte Probe.

B.7.6.3 Auftragen der BSA-Kalibrierkurve

Die BSA-Kalibrierkurve wird wie folgt aufgetragen:

- a) Die normalisierte BSA-Konzentration ($\mu\text{g/ml}$, x-Achse) muss gegen die korrigierte normalisierte mittlere Probenabsorption (N_{BSA} , y-Achse) aufgetragen werden, und es muss eine Ausgleichsgerade mittels linearer Regression (der Form $y = mx + c$) erstellt werden.
- b) Die Steigung der Gerade (x-Koeffiziententerm), der Schnittpunkt mit der Koordinatenachse (c-Schnittpunktterm) und das Bestimmtheitsmaß R^2 (muss $> 0,990$ sein) müssen bestimmt und aufgezeichnet werden (siehe Tabelle E.1). Die Funktionsterme müssen zum Berechnen der Proteinkonzentration der Prüfanschmutzung in den Untersuchungsproben für Negativkontroll-, Positivkontroll- und Tauchversuch-STP verwendet werden.

ANMERKUNG Der Schnittpunkt c kann ein von Null abweichender Wert sein, wenn die aufgetragene Gerade nicht durch den Koordinatenursprung verläuft.

B.8 Negativ- und Positivkontrollen

B.8.1 STP für Negativkontrollen

Zur Bestimmung der Hintergrundkonzentration jeglicher Störsubstanzen müssen Blindwert-Bestimmungen mit unbeschichteten STP durchgeführt werden. Vor der Prüfung wird sichergestellt, dass die Masse der als Negativkontrollen verwendeten STP (N1, N2) bestimmt und aufgezeichnet wurde. Die Proteinbestimmung an den STP für Negativkontrollen muss nach der Erstellung der BSA-Kalibrierkurve vorgenommen werden.

Nach der STP-Extraktion mit dem Elutionsverfahren folgt die Bestimmung der in beiden einzelnen STP vorliegenden Proteinmenge (als BSA-Äquivalente) mit dem OPA-Verfahren, um die korrigierte normalisierte mittlere Probenabsorption (N_{E}) zu bestimmen, worauf die aus der BSA-Kalibrierkurve abgeleiteten Funktionsterme angewendet werden.

Die Nachweisgrenze muss die für die Reagenzienkontrolle A erhaltene Absorbierung sein (siehe B.7.5.3).

B.8.1.1 Messung des Proteingehalts der Negativkontroll-STP

Der Proteingehalt der Negativkontroll-STP wird wie folgt gemessen:

- a) Die STP-Extraktion wird mit dem Elutionsverfahren durchgeführt (siehe B.6). Das STP wird für die gravimetrische Bestimmung behalten (siehe B.10).
- b) Vor der Fortsetzung wird sichergestellt, dass die Systemeignungskontrollen (siehe B.7.5.2) und Reagenzienkontrollen (siehe B.7.5.3) am gleichen Tag durchgeführt wurden.

Am Spektrometer darf zu keinem Zeitpunkt eine automatische Nullpunktkorrektur vorgenommen werden.

- c) Mit einer kalibrierten automatischen Pipette werden gleiche Volumina der Reagenzienkontrolle A und der aus dem Negativkontroll-STP extrahierten Elutionslösung (jeweils 1,50 ml) in die Küvette gegeben.
- d) Der Küvetteninhalt wird mit einer Pipette für den Einmalgebrauch durchmischt. Es sollte darauf geachtet werden, die Bildung von Luftblasen auf ein Mindestmaß zu verringern, da diese die Messung mit dem Spektrometer stören können.
- e) Die Küvette wird für 60 s bis 90 s stehen gelassen, worauf sicherzustellen ist, dass die Probe nicht trüb ist.

- f) Die Probe wird in das UV-VIS-Spektrometer eingesetzt, und es werden drei Messwerte für die Lösung genommen. Der Mittelwert wird aufgezeichnet (siehe Tabelle E.3).

ANMERKUNG Die erhaltene Absorption entspricht der für Negativkontrollprobe/Eigenabsorption.

- g) Die Küvette wird entnommen und der Inhalt verworfen, worauf zweimal mit der SDS-Lösung von 1 % (m/V) gespült wird.
- h) Mit einer kalibrierten automatischen Pipette werden gleiche Volumina des OPA-Reagens und der aus dem Negativkontroll-STP extrahierten Elutionslösung (jeweils 1,50 ml) in die Küvette gegeben.
- i) Der Küvetteninhalt wird mit einer Pipette für den Einmalgebrauch durchmischt. Es sollte darauf geachtet werden, die Bildung von Luftblasen auf ein Mindestmaß zu verringern, da diese die Messung mit dem Spektrometer stören können.
- j) Die Küvette wird für 60 s bis 90 s stehen gelassen, worauf sicherzustellen ist, dass die Probe nicht trüb ist.
- k) Die Küvette wird in das UV-VIS-Spektrometer eingesetzt, und es werden drei Messwerte von der Lösung genommen. Der Mittelwert wird aufgezeichnet (siehe Tabelle E.3).

ANMERKUNG Die erhaltene Absorption entspricht der für Negativkontrollprobe/OPA-Reagens.

- l) Die Küvette wird entnommen und der Inhalt verworfen, worauf zweimal mit der SDS-Lösung von 1 % (m/V) gespült wird.
- m) B.8.1.1 a) bis B.8.1.1 l) werden für das andere Negativkontroll-STP wiederholt.

B.8.1.2 Korrigierte normalisierte mittlere Probenabsorptionen ($^NE_{negn}$)

B.8.1.2.1 Für jede Negativkontrollprobe wird die jeweilige mittlere Absorption berechnet und anschließend durch Subtraktion normalisiert, wofür die Reagenzienkontrollen eingesetzt werden (siehe Tabelle E.3).

- a) Normalisierte Probe/Eigenabsorption ($^{SA}E_n$) = Absorptions-Mittelwert – Mittelwert der Reagenzienkontrolle A
- b) Normalisierte Probe/OPA-Reagens ($^{OPA}E_n$) = Absorptions-Mittelwert – Mittelwert der Reagenzienkontrolle B
- c) Korrigierte normalisierte mittlere Probenabsorption für Negativkontroll-STP: $^NE_n = ^{OPA}E_n - ^{SA}E_n$

Dabei ist n 1 oder 2 in Bezug auf STP N1 oder N2.

B.8.1.2.2 Die Proteinmenge (mg) wird für jedes untersuchte Negativkontroll-STP mit der folgenden Gleichung (B.1) berechnet, wobei die Terme x (Koeffizient) und c (Schnittpunkt) zuvor über die BSA-Kalibrierkurve bestimmt wurden:

$$\left(\frac{^NE - c}{x} \right) \div 50 \quad (B.1)$$

Anschließend wird der mittlere Proteingehalt für die Negativkontroll-STP berechnet (siehe Tabelle E.3).