



HAL
open science

Le nettoyeur à vapeur a-t-il une place dans la prise en charge des dispositifs médicaux réutilisables à corps creux en stérilisation ?

Aurélie Bros

► To cite this version:

Aurélie Bros. Le nettoyeur à vapeur a-t-il une place dans la prise en charge des dispositifs médicaux réutilisables à corps creux en stérilisation ?. Sciences pharmaceutiques. 2016. dumas-01382822

HAL Id: dumas-01382822

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01382822v1>

Submitted on 17 Oct 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact au SID de Grenoble :
bump-theses@univ-grenoble-alpes.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

<http://www.cfcopies.com/juridique/droit-auteur>

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

**UNIVERSITE GRENOBLE ALPES
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE**

Année 2016

N°

**MEMOIRE DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES DE PHARMACIE
HOSPITALIERE PRATIQUE ET RECHERCHE**

Conformément aux dispositions du décret N° 90-810 du 10 septembre 1990, tient lieu de THESE

***LE NETTOYEUR A VAPEUR A-T-IL UNE PLACE
DANS LA PRISE EN CHARGE DES DISPOSITIFS MEDICAUX REUTILISABLES
A CORPS CREUX EN STERILISATION ?***

Aurélie BROS

[Données à caractère personnel]

THESE SOUTENUE PUBLIQUEMENT A LA FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Le 30 septembre 2016

DEVANT LE JURY COMPOSE DE

Président du jury : Monsieur le Professeur WOUESSIDJEWÉ Denis

Directrice de thèse : Madame le Docteur GUIMIER Catherine

Madame le Professeur SAUTOU Valérie

Monsieur le Docteur LAMBERT Christophe

Monsieur CHOISNARD Luc

Doyen : SEVE Michel

Vice-doyenne : DEMEILLIERS Christine

Année 2015-2016

ENSEIGNANTS A L'UFR DE PHARMACIE

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

BAKRI	Aziz	Pharmacie Galénique et Industrielle, Formulation et Procédés Pharmaceutiques (TIMC-IMAG)
BOUMENDJEL	Ahcène	Chimie Organique (D.P.M.)
BURMEISTER	Wim	Biophysique (U.V.H.C.I)
DECOUT	Jean-Luc	Chimie Inorganique (D.P.M.)
DROUET	Christian	Immunologie Médicale (TIMC-IMAG)
DROUET	Emmanuel	Microbiologie (U.V.H.C.I) -
GODIN-RIBUOT	Diane	Physiologie-Pharmacologie (HP2)
LENORMAND	Jean Luc	Ingénierie Cellulaire, Biothérapies (THEREX, TIMC, IMAG)
MARTIN	Donald	Laboratoire TIMC-IMAG (UMR 5525 UJF-CNRS)
MOINARD	Christophe	LABFA (U Inserm 1055)
PEYRIN	Eric	Chimie Analytique (D.P.M.)
RIBUOT	Christophe	Physiologie – Pharmacologie (HP2)
WOUESSIDJEW	Denis	Pharmacotechnie (D.P.M.)

PROFESSEURS DES UNIVERSITES-PRATICIENS HOSPITALIERS

ALLENET	Benoit	Pharmacie Clinique (THEMAS TIMC-IMAG/MCU-PH)
CORNET	Murielle	Parasitologie – Mycologie Médicale (LAPM, PU-PH)
DANEL	Vincent	Toxicologie (SMUR SAMU / PU-PH)
FAURE	Patrice	Biochimie (HP2/PU-PH)
MOSSUZ	Pascal	Hématologie (PU-PH-THEREX-TIMC)
SEVE	Michel	Biochimie – Biotechnologie (IAB, PU-PH)

PROFESSEURS EMERITES

CALOP	Jean
GRILLOT	Renée
ROUSSEL	Anne-Marie

Dernière mise à jour : NM 16/02/2016

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES

ALDEBERT	Delphine	Parasitologie-Mycologie (L.A.P.M)
BATANDIER	Cécile	Nutrition et Physiologie (L.B.F.A)
BELAIDI-CORSAT	Elise	Pharmacologie Physiologie –(HP2)
BOURGOIN	Sandrine	Biochimie – Biotechnologie (IAB)
BRETON	Jean	Biologie Moléculaire / Biochimie (L.C.I.B – LAN)
BRIANCON-MARJOLLET	Anne	Physiologie Pharmacologie (HP2)
BUDAYOVA SPANO	Monika	Biophysique (I.B.S)
CAVAILLES	Pierre	Biologie Cellulaire et génétique (L.A.P.M)
CHOISNARD	Luc	Pharmacotechnie (D.P.M)
DELETRAZ-DELPORTE	Martine	Droit Pharmaceutique (Equipe SIS « Santé, Individu, Société »-EAM 4128)
DEMEILLIERS	Christine	Biochimie (L.B.F.A)
DURMORT-MEUNIER	Claire	Biotechnologies (I.B.S)
GEZE	Annabelle	Pharmacotechnie (D.P.M)
GILLY	Catherine	Chimie Thérapeutique (D.P.M)
GROSSET	Catherine	Chimie Analytique (D.P.M)
GUIEU	Valérie	Chimie Analytique (D.P.M)
HININGER-FAVIER	Isabelle	Biochimie (L.B.F.A)
JOYEUX-FAURE	Marie	Physiologie - Pharmacologie (HP2)
KHALEF	Nawel	Pharmacie Galénique (TIMC-IMAG)
KRIVOBOK	Serge	Biologie Végétale et Botanique (L.C.B.M)
MELO DE LIMA	Christelle	Biostatistiques (L.E.C.A)
MOUHAMADOU	Bello	Cryptogamie, Mycologie Générale (L.E.C.A)
NICOLLE	Edwige	Chimie Thérapeutique (D.P.M)
OUKACINE	Farid	Chimie Thérapeutique (D.P.M)
PERES	Basile	Pharmacognosie (D.P.M)
PEUCHMAUR	Marine	Chimie Organique (D.P.M.)
RACHIDI	Walid	Biochimie (L.C.I.B)
RAVELET	Corinne	Chimie Analytique (D.P.M)
SOUARD	Florence	Pharmacognosie (D.P.M)
TARBOURIECH	Nicolas	Biophysique (U.V.H.C.I.)
VANHAVERBEKE	Cécile	Chimie (D.P.M)

MAITRES DE CONFERENCE DES UNIVERSITES-PRATICIENS HOSPITALIERS

BEDOUC	Pierrick	Pharmacie Clinique (THEMAS TIMC-IMAG/MCU-PH)
BUSSER	Benoit	Pharmacie (IAB-INSERM)
GERMI	Raphaëlle	Microbiologie (U.V.H.C.I)

PROFESSEURS CERTIFIES

FITE	Andrée
GOUBIER	Laurence

PROFESSEURS ET MAITRES DE CONFERENCE ASSOCIES (PAST/MAST)

BELLET	Béatrice	Pharmacie Clinique
RIEU	Isabelle	Qualitologie (Praticien Attaché – CHU)
TROUILLER	Patrice	Santé Publique (Praticien Hospitalier – CHU)

PROFESSEURS AGREGES (PRAG)

GAUCHARD	Pierre-Alexis	(D.P.M)
-----------------	---------------	---------

CHU : Centre Hospitalier Universitaire
CIB : Centre d'Innovation en Biologie
DPM : Département de Pharmacochimie Moléculaire
HP2 : Hypoxie Physiopathologie Respiratoire et Cardiovasculaire
IAB : Institut Albert Bonniot, Centre de Recherche « Oncogenèse et Ontogenèse »
IBS : Institut de Biologie Structurale
LAPM : Laboratoire Adaptation et Pathogenèse des Microorganismes
LBFA : Laboratoire Bioénergétique Fondamentale et Appliquée
LCBM : Laboratoire Chimie et Biologie des Métaux
LCIB : Laboratoire de Chimie Inorganique et Biologie
LECA : Laboratoire d'Ecologie Alpine
LR : Laboratoire des Radio pharmaceutiques
TIMC-IMAG : Laboratoire Technique de l'Imagerie, de la Modélisation et de Cognition
UVHCI : Unit of Virus Host Cell Interactions

REMERCIEMENTS

A *Catherine*, pour votre soutien bienveillant et votre douceur. Ce fut un plaisir de travailler à vos côtés. Vos compétences professionnelles et vos qualités humaines continueront de m'inspirer.

A *Christophe Lambert*, d'avoir accepté de quitter la contrée chambéroise et de m'avoir fait l'honneur de porter attention à ce travail.

A *Valérie Sautou*, d'avoir accepté de juger ce travail. Nos chemins se sont croisés à Clermont-Ferrand, en souvenir de ces bons moments.

A *Luc et Roseline*, pour votre disponibilité, votre aide précieuse pour ce travail et vos enseignements. Sans vous, je ne serai pas arrivée bien loin (même pas jusqu'au spectro) !

A *Denis Wouessidjewe*, de me faire l'honneur de présider ce jury. Recevez l'expression de mes remerciements les plus sincères.

A *Nathalie*, pour tes conseils et ta sympathie.

A *l'équipe de la Sté'*, toujours souriante et disponible.

Aux *confrères et collègues* d'Alsace, d'Auvergne et de Rhône-Alpes, qui m'ont enrichie professionnellement et humainement.

A *mes parents*, sans qui je n'aurais pas pu réaliser ce parcours. Toujours présents, toujours à l'écoute. Vous êtes formidables, ne changez rien !

A *mes grands-parents et ma famille*. Merci pour votre soutien et votre bonne humeur.

A *Pauline* (et *Zilou* !), qui me ramène toujours les pieds sur terre. Bientôt 20 ans...

A *Louise*, qui a abandonné conjoint et enfants pour boucler avec moi les études que nous avons débutées ensemble.

A *Céline, Noem', Major, Clo, Valou, La Gantz, Vivi, Evek, Tiff* et les autres Strasbourgeois, loin des yeux mais près du cœur.

A *Karen*, qui a succombé comme moi à l'appel de la montagne.

A *la team Stéphanoise*, sans qui la cérémonie du thé n'a plus la même saveur.

A *Audrey, Lucie & Marine*, qui me prouvez chaque jour que tout est possible ! Mes plus belles rencontres durant cet internat.

A *Paulo*, le seul homme de la coloc. Tu as bien du courage et nous la chance de t'avoir !

A *Momo, Wass et Ma'*, mon soutien à domicile !

A *mes co-internes grenoblois*, qu'ils soient pharmaciens, biologistes ou médecins, haltérophiles, grimpeurs ou tout simplement buveurs de bières !

A *TOUTES* ces belles rencontres,

A *Vincent*, pour tout ce que tu m'apportes au quotidien malgré les quelques 531 kms qui nous séparent.

Le chemin importe peu, la volonté d'arriver suffit à tout.
Albert Camus

SOMMAIRE

GLOSSAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS

TABLE DES PRESENTATIONS ET DES ANNEXES

I.	INTRODUCTION	16
A.	Rationnel de l'étude	16
1.	Contexte	16
2.	Description du processus de stérilisation actuellement en vigueur en France	17
3.	Focus sur l'étape de nettoyage	21
4.	Les différentes méthodes de contrôle de l'étape de nettoyage	26
B.	Objectif.....	31
II.	MATERIELS & METHODES	32
A.	Choix des dispositifs d'épreuve de procédé	32
B.	Choix de la souillure	32
C.	Validation de la méthode de dosage des protéines résiduelles totales au BCA.....	33
1.	Validation de la linéarité du kit	33
2.	Validation de la méthode dans les conditions expérimentales	33
D.	Conditions expérimentales	35
1.	Etude expérimentale réalisée avec du sang prélevé sur tube hépariné.....	35
2.	Etude expérimentale réalisée avec du sang prélevé sur tube sec	39
3.	Etude expérimentale réalisée avec du sang prélevé sur tube sec et en situation défavorable.....	39
III.	RESULTATS	41
A.	Validation de la méthode de dosage des protéines résiduelles totales au BCA.....	41
1.	Validation de la linéarité du kit	41
2.	Validation de la méthode dans les conditions expérimentales	41
B.	Conditions expérimentales	45
1.	Etude expérimentale avec du sang prélevé sur tube hépariné	45
2.	Etude expérimentale avec du sang prélevé sur tube sec.....	46
IV.	DISCUSSION	50
A.	Choix des dispositifs d'épreuve de procédé	50
B.	Choix de la souillure	51
C.	Choix de la méthode de dosage protéique.....	52
D.	Validation de la méthode de dosage des protéines résiduelles totales au BCA.....	54

1.	Validation de la linéarité du kit	54
2.	Validation de la méthode dans les conditions expérimentales	54
E.	Conditions expérimentales	59
1.	Etude expérimentale avec du sang prélevé sur tube hépariné	59
2.	Etude expérimentale avec du sang prélevé sur tube sec.....	61
F.	Discussion globale de l'étude.....	67
	CONCLUSION.....	72
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	74
	ANNEXES	78

GLOSSAIRE

Dispositif médical

On entend par dispositif médical tout instrument, appareil, équipement, matière, produit, à l'exception des produits d'origine humaine, ou autre article utilisé seul ou en association, y compris les accessoires et logiciels intervenant dans son fonctionnement, destiné par le fabricant à être utilisé chez l'homme à des fins médicales et dont l'action principale voulue n'est pas obtenue par des moyens pharmacologiques ou immunologiques ni par métabolisme, mais dont la fonction peut être assistée par de tels moyens (1).

Dispositif d'épreuve de procédé

Le dispositif d'épreuve de procédé (DEP), ou Process Challenge Device (PCD) est un article conçu pour constituer une résistance définie à un procédé de stérilisation et destiné à évaluer l'efficacité du procédé.

Exactitude

L'exactitude est l'étroitesse de l'accord entre la valeur moyenne trouvée en faisant un certain nombre de mesure et une valeur acceptée comme étant conventionnellement vraie ou une valeur de référence.

Infection associée aux soins

Une infection est dite associée aux soins si elle survient au cours ou au décours d'une prise en charge (diagnostique, thérapeutique, palliative, préventive ou éducative) d'un patient, et si elle n'était ni présente, ni en incubation au début de la prise en charge.

Laveur désinfecteur

Dispositif médical destiné au nettoyage et à la désinfection du matériel réutilisable et tous les autres dispositifs utilisés dans le milieu médical, dentaire, pharmaceutique ou vétérinaire (2).

Linéarité

La linéarité d'une méthode d'analyse est sa capacité à donner des résultats qui sont directement (à l'intérieur de certaines limites) proportionnels à la concentration (quantité) de la substance analysée dans un échantillon.

Non-conformité

Non satisfaction d'une exigence.

Précision / Fidélité

La précision d'une méthode correspond au degré d'accord (degré de dispersion) entre les résultats des mesures obtenues par l'analyse individuelle de plusieurs prélèvements d'un même échantillon homogène, prélevés dans des conditions prescrites. La précision est généralement exprimée par la variance, l'écart-type ou le coefficient de variation d'un ensemble de mesures.

Répétabilité

La répétabilité est une expression de la précision de l'analyse lorsque celle-ci est reprise dans les mêmes conditions de réalisation, après un court intervalle de temps.

Reproductibilité (fidélité intermédiaire)

Variabilité aléatoire des résultats de plusieurs déterminations d'un même échantillon, effectués de manière espacée dans le temps et dans des conditions qui peuvent être expérimentalement différentes.

LISTE DES ABREVIATIONS

AKI : Groupe de Travail de Retraitement des Instruments

AMDEC : Analyse des Modes de Défaillances, de leurs Effets et de leur Criticité

BCA: Bicinchoninic Acid Assay

BSA: Bovin Serum Albumin

CDC: Centers For Disease Control And Prevention

CE : Canule Ecouvillonnable

CHUGA : Centre Hospitalier Universitaire de Grenoble Alpes

CNE : Canule Non Ecouvillonnable

DEP : Dispositif d'Epreuve de Procédé

DGSV : Société Allemande de Retraitement des Dispositifs Médicaux Stériles

DGKH : Société Allemande d'Hygiène Hospitalière

DM: Dispositif Médical

DMRS : Dispositif Médical Réutilisable Stérile

DMS: Dispositif Médical Stérile

FDA : Food And Drug Administration

LD : Laveur Désinfecteur

MCI : Maladie De Creutfeldt-Jakob

MIC: Chirurgie Mini-Invasive

NaCl : Chlorure de Sodium

NV : Nettoyeur A Vapeur

PUI : Pharmacie à Usage Intérieur

SDS : Sodium Dodécyl Sulfate

SSSH : Société Suisse de Stérilisation Hospitalière

STD : standard

US : Ultrasons

VAH : Association Allemande Pour L'hygiène Appliquée

TABLE DES PRESENTATIONS ET DES ANNEXES

LISTE DES FIGURES ET ILLUSTRATIONS

Figure 1 - Représentation des étapes de traitement d'un dispositif médical réutilisable

Figure 2 - Plan expérimental résumant les étapes clés d'un essai

Figure 3 - Plan d'échantillonnage des trois méthodes de nettoyage envisagées après l'étape de pré-désinfection

Figure 4 - Plan d'échantillonnage des trois méthodes de nettoyage envisagées après l'étape de pré-désinfection modifié (avec et sans étape de dessiccation des souillures)

Illustration 1 - Bac à ultrasons

Illustration 2 - Nettoyeur à vapeur

Illustration 3 - Etude « Multi-Center Lumen Inspection Survey » présentée à International Association of Healthcare Central Service Materiel Management (IAHCSMM) National Convention en 2015

Illustration 4 - Alésoir composé d'un arbre flexible et d'une tête

Illustration 5 - Etapes réactionnelles de la méthode au BCA

Illustration 6a - Canule écouvillonnable et écouvillon adapté

Illustration 6b - Canule non écouvillonnable

LISTE DES GRAPHIQUES

Graphique 1 - Spectre d'absorption de l'hémoglobine sous sa forme libre et saturée

Graphique 2 - Droite obtenue par la méthode des ajouts dosés pour la détermination de la concentration protéique de l'échantillon de sang humain utilisé

Graphique 3 - Représentation de la droite étalon avec BSA à 562nm

Graphique 4 - Représentation graphique de la régression linéaire des résultats des 3 jours de validation de la méthode au BCA

Graphique 5 - Représentation graphique de l'intervalle de confiance (95%) de linéarité de la méthode au BCA

Graphique 6 - Représentation graphique des moyennes d'absorbance et intervalles de confiance des échantillons homogènes pour l'évaluation de l'impact de la filtration à 0.22 µm

Graphique 7 - Représentation graphique des résultats du test de Tukey de comparaison des moyennes des groupes d'échantillons « filtrés », « non filtrés » et « filtrés et incubés »

Graphique 8 - Absorbance à 562nm de chaque échantillon de CE après passage en LD

Graphique 9 - Absorbance à 562nm de chaque échantillon de CNE après passage en LD

Graphique 10 - Représentation graphique des résultats d'absorbance des CE, CNE et DM standards (STD) avec sang séché (sec) ou non séché (non sec) après passage en LD sans pré-nettoyage

Graphique 11 - Représentation graphique des résultats d'absorbance des CE et CNE avec sang séché (sec) ou non séché (non sec) après pré-nettoyage dans le bac à ultrasons (US) ou avec le nettoyeur à vapeur (NV) puis passage en LD

Graphique 12 - Représentation graphique des moyennes et intervalles de confiance 95% (IC95%) des résultats d'absorbance des CE et CNE avec sang séché (sec) ou non séché (non sec) après pré-nettoyage dans le bac à ultrasons (US) ou avec le nettoyeur à vapeur (NV) puis passage en LD

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 - Critères d'acceptation pour l'évaluation de la performance du nettoyage pour les dispositifs médicaux souillés en conditions réelles

Tableau 2 - Critères d'acceptation pour l'évaluation de la performance du nettoyage pour les dispositifs d'épreuve de procédé (pince de crile)

Tableau 3 - Avantages et inconvénients du nettoyeur à vapeur

Tableau 4 - Evaluation de chaque étape du processus « pré-désinfection » par la méthode AMDEC

Tableau 5 - Moyens de maîtrise des étapes du processus « pré-désinfection » précédemment

sélectionnés dans le Tableau 4

Tableau 6 - Résultats des mesures d'absorbance pour l'évaluation de la linéarité du kit BCA

Tableau 7 - Données utilisées pour l'évaluation de la linéarité de la méthode de dosage protéique au BCA en conditions expérimentales

Tableau 8 - Données utilisées pour l'évaluation de la l'exactitude de la méthode de dosage protéique au BCA en conditions expérimentales

Tableau 9 - Données utilisées pour l'évaluation de la fidélité de la méthode de dosage protéique au BCA en conditions expérimentales

Tableau 10 - Valeurs d'absorbance des cinq échantillons homogènes pour les essais de détermination de l'effet de filtration

Tableau 11 - Résultats des mesures d'absorbance des échantillons de CE traités en LD

Tableau 12 - Résultats des mesures d'absorbance des échantillons de CNE traitées en LD

Tableau 13 - Résultats des mesures d'absorbance des échantillons de CE et CNE traitées en laveur désinfecteur

Tableau 14 - Résultats des mesures d'absorbance des échantillons de CE et CNE nettoyées au US+LD ou NV+LD

Tableau 15 - Liste des substances compatibles avec le kit BCA fourni

Tableau 16 - Adsorption de protéines sur la surface d'un polymère

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 - Procédure institutionnelle de pré-désinfection des dispositifs médicaux réutilisables

Annexe 2 - Mode opératoire de la méthode de dosage de protéines résiduelles totales au BCA

Annexe 3- Tableau comparatif de trois niveaux de résultats

I. INTRODUCTION

A. Rationnel de l'étude

1. Contexte

À la différence des dispositifs médicaux stériles (DMS) à usage unique, les dispositifs médicaux stériles réutilisables (DMRS) présentent un risque infectieux de contamination inter-patient. En effet, un dispositif médical (DM) utilisé au cours d'une intervention chirurgicale est contaminé par les agents pathogènes présents dans les liquides biologiques ou tissus du patient pris en charge. Les agents transmissibles conventionnels sont classés en 6 catégories, parmi lesquelles les bactéries qui existent sous forme végétative ou sporulée. Cette dernière forme présente une très haute résistance aux procédés de désinfection ou de stérilisation. Les endotoxines, composants de la paroi des bactéries Gram négatif, sont libérées lors de leur lyse. Elles sont responsables des manifestations systémiques, telles qu'un choc septique. Elles présentent également une très haute résistance aux procédés de désinfection ou de stérilisation (3). Les autres agents pathogènes sont les virus, les parasites microscopiques, les champignons et les prions. Ces derniers sont responsables des encéphalopathies subaiguës spongiformes transmissibles (ESST), telles que la maladie de Creutzfeldt-Jakob (MCJ) (4).

Ce risque infectieux est maîtrisé grâce au processus de stérilisation qui occupe une place privilégiée dans la lutte contre les infections associées aux soins. La centralisation de ce processus, placé sous la responsabilité du pharmacien de la pharmacie à usage intérieur (P.U.I.) de l'établissement de santé, a fortement sécurisé cette activité et permis d'assurer la qualité de la stérilisation des DM (5). Environ 5% des patients qui séjournent à l'hôpital contractent une infection. Le risque varie selon le profil du patient, le niveau d'hygiène ou encore les soins pratiqués. Les germes responsables proviennent le plus souvent du patient lui-même, mais ils

peuvent aussi être transportés sur le site infectieux par l'intermédiaire du personnel ou de dispositifs médicaux (DM) (6). Les infections sont considérées comme associées aux soins lorsqu'elles surviennent dans les 30 jours suivants l'intervention, ou, s'il y a mise en place d'un dispositif médical implantable, dans l'année suivant l'intervention (7).

Une revue de la littérature rapporte de rares cas d'infections ayant pour origine la contamination du patient par un dispositif médical potentiellement non stérile. En 2009, au Texas, il a été constaté que des canules d'aspiration, d'irrigation et des pièces à main de rasoirs arthroscopiques présentaient des résidus de tissus qui auraient pu permettre aux bactéries de résister au processus de stérilisation (8). Ces instruments ont été incriminés dans des cas d'infection à *Pseudomonas aeruginosa* sur site opératoire. A la suite de son enquête sur cette contamination croisée de rasoirs arthroscopiques, la Food and Drug Administration (FDA) a émis une alerte aux hôpitaux sur les méthodes de retraitement des dispositifs médicaux (9).

En réponse à cette alerte, une équipe de professionnels en gestion des risques et de personnels de bloc opératoire de l'hôpital universitaire du Michigan ont entrepris de tester les méthodes de nettoyage recommandées par les fabricants pour les instruments chirurgicaux avec l'objectif d'en déterminer l'efficacité. Le projet d'amélioration de la qualité était axé sur les dispositifs d'aspiration car ils sont utilisés dans la plupart des interventions chirurgicales, sont exposés à des niveaux élevés de débris organiques, et sont difficiles à nettoyer. Grâce à une caméra, l'étude a montré que des débris ont été retrouvés à des localisations inattendues. Les auteurs ont conclu que les méthodes de nettoyage recommandées par les fabricant et donc appliquées au quotidien, ne sont pas efficaces (10).

2. Description du processus de stérilisation actuellement en vigueur en France

Afin d'assurer la sécurité du patient et ne pas l'exposer à un risque d'infection, tout dispositif médical critique réutilisable préalablement utilisé pour un autre patient, doit subir un

traitement adapté pour le rendre stérile (11). La notion de stérilité signifie que la probabilité théorique qu'un micro-organisme viable soit présent sur un dispositif doit être égale ou inférieure à 1 pour 10⁶ (NF EN 556). La stérilisation est un procédé visant à rendre stérile la charge à stériliser (NF EN 285).

La ligne directrice n°1 des Bonnes Pratiques de Pharmacie Hospitalière définit d'une part, l'étape de pré-désinfection et d'autre part, les étapes de lavage, conditionnement, stérilisation proprement dite, contrôles des différentes opérations, stockage et mise à disposition (Figure 1). En dehors de la pré-désinfection, ces opérations sont obligatoirement mises en œuvre par la PUI dans les locaux affectés à cette activité (12). D'ailleurs, la Direction des Hospitalisations et de l'Organisation des Soins rappelle en 2007 que les protocoles excluant la pré-désinfection immédiate en sortie de bloc pour la confier aux services de stérilisation ne sont envisageables qu'à la condition d'un traitement le plus rapidement possible par un laveur désinfecteur (LD) (13).

Ainsi, après l'utilisation d'un DMR lors d'une intervention chirurgicale, celui-ci est rapidement pré-désinfecté. Cette pratique, principalement rencontrée en France et en Suisse, s'effectue avant transport sur le lieu de stérilisation. Elle consiste à immerger les DMR aussitôt après leur utilisation dans un bac contenant une solution détergente et désinfectante, répondant aux normes en vigueur (11). L'objectif est d'éviter la dessiccation des liquides biologiques ou morceaux de tissus présents sur les instruments, d'éviter la création d'un biofilm, de réduire la charge microbienne, de faciliter le nettoyage ultérieur, de protéger le personnel et l'environnement lors du transport vers le lieu de la stérilisation (12). Elle s'effectue donc sur le lieu d'utilisation tel que les services d'hospitalisation, les services médico-techniques ou les blocs opératoires. Le respect de cette procédure doit être strict, d'autant plus qu'elle est susceptible d'être menée en dehors des horaires d'ouverture de la stérilisation. Il est donc primordial d'éviter tout risque de dessiccation qui compromettrait l'efficacité des étapes

ultérieures et donc le résultat final.

L'étape suivante est celle du lavage qui associe une action chimique (détergent), physique (chaleur) et mécanique (aspersion, frottements). Cette opération se fait préférentiellement dans un automate, permettant d'assurer une meilleure efficacité et reproductibilité que le nettoyage manuel. Il existe des LD simples pour instruments et des appareillages spécifiques pour le lavage des instruments de dentisterie. Les bacs à ultrasons (US) avec ou sans irrigation des corps creux ainsi que les nettoyeurs à vapeurs (NV) sont utilisés en complément du LD.

C'est au cours de la dernière phase de rinçage du cycle de lavage en LD, avec une eau de qualité osmosée portée à la température de 80°C à 96°C pendant un temps pouvant varier de 1 min à 10 min, que s'effectue l'étape de désinfection (objectif requis : A0 3000 secondes soit par exemple 90 °C pendant 5 minutes). L'eau chaude détruit les formes végétatives des bactéries, les champignons microscopiques, les virus, et les parasites microscopiques (12).

A l'issue du lavage, les dispositifs médicaux doivent être secs. Si la phase de séchage du laveur est insuffisante, un séchage complémentaire doit être assuré au moyen de chiffonnettes non pelucheuses, d'air médical ou en armoire séchante. Ainsi, l'adage « on ne stérilise bien que ce qui est propre et sec » est respecté.

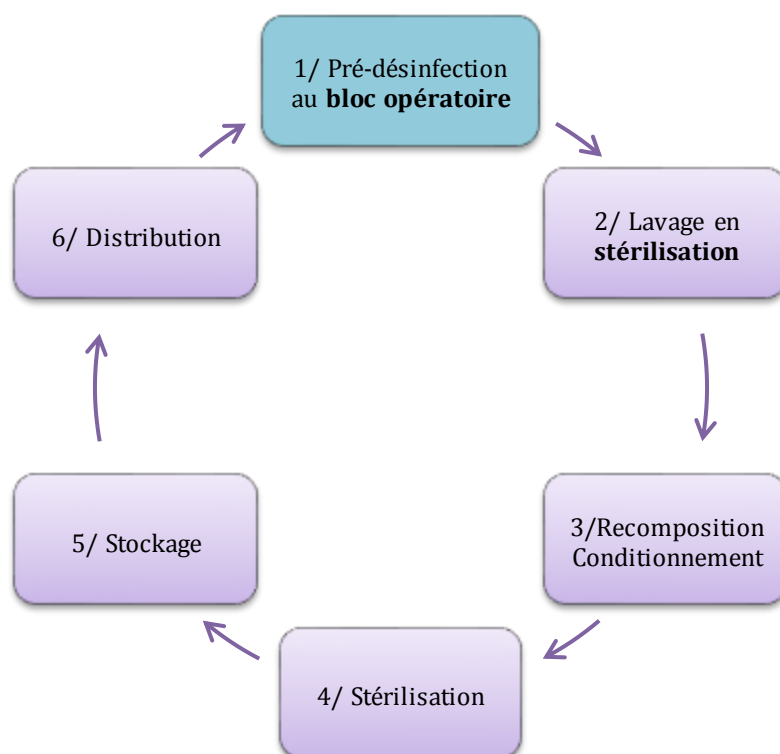
La reconstitution est l'étape nécessaire pour qu'un ensemble de DM réunis et présentés dans des plateaux ou paniers adaptés réponde, lors de son utilisation pour le patient, à des critères de stérilité, de fiabilité, et de reproductibilité. Ainsi, chaque composition ayant un intitulé précis sera toujours identique, pour une mise à disposition optimale lors de l'acte chirurgical.

Afin de garantir la pérennité de l'état stérile, le dispositif médical doit être emballé avant son passage dans le stérilisateur. Nous disposons d'emballages réutilisables tels que les conteneurs, recevant les plateaux ou paniers qui ont été recomposés, des emballages non réutilisables tels que les sachets tout en papier, en matière plastique ou mixte papier-plastique, à sceller avant introduction dans le stérilisateur ou des feuilles de non tissé. Le conditionnement et les emballages sont définis par les normes NF EN ISO 11 607-1 (14), 11 607-2 (15), et NF EN

868-2 à 868-10 (16).

La stérilisation par la chaleur humide est le procédé de choix pour la stérilisation des DMR dans les établissements de soins. Il s'agit de vapeur d'eau saturée sous pression à 134°C et répondant aux normes NF EN 285+A2 (grands stérilisateurs) ou NF EN 13 060+A2 (petits stérilisateurs) (17)(18). Les cycles, pour être efficaces et maîtrisables, doivent comporter des pulsations de vapeur en phase de pré-traitement pour optimiser l'élimination de l'air résiduel et atteindre le vide. Le peroxyde d'hydrogène et l'ozone connaissent actuellement un essor avec le développement de la chirurgie robotisée faisant appel à des DM thermosensibles. Ces deux procédés sont d'ailleurs appuyés par les nouvelles recommandations conjointes de la SF2S et la SF2H (19)(20).

Figure 1 : Représentation des étapes de traitement d'un dispositif médical réutilisable



Pour assurer la performance du procédé de stérilisation, une attention particulière et une parfaite maîtrise de toutes les étapes, depuis la pré-désinfection jusqu'à la stérilisation, est exigée

puisqu'il n'existe pas de contrôle final de l'état stérile. C'est pourquoi, il est important de connaître les spécificités de l'instrumentation, afin de pouvoir y appliquer les méthodes de stérilisation optimales. Il faut aussi rappeler que c'est le fabricant qui fixe les modalités de traitement du DM qu'il commercialise, à savoir, la procédure de désinfection, de nettoyage ou de stérilisation, ainsi que le nombre limité de réutilisations, donc de re-stérilisations, le cas échéant.

3. Focus sur l'étape de nettoyage

- **Aspect réglementaire**

Dans un processus de stérilisation, si l'étape de stérilisation doit être parfaitement maîtrisée, un nettoyage soigneux est la condition sine qua non d'un abaissement efficace de la charge contaminante indispensable à une stérilisation sûre (21). Selon la norme NF EN ISO 15883-1, l'étape de nettoyage des dispositifs médicaux correspond à une « élimination de la contamination d'un article jusqu'au niveau requis pour son traitement ultérieur et pour l'utilisation à laquelle il est destiné », c'est-à-dire éliminer les souillures visibles ou microscopiques, abaisser la contamination au niveau le plus bas possible et prévenir la formation d'un biofilm. Le risque étant que les souillures résiduelles protègent les micro-organismes de l'atteinte d'agents stérilisants. Dans ce contexte, nous nous sommes interrogés sur la définition de ce niveau de propreté requis et sur la possibilité de définir un Niveau d'Assurance Propreté ? Il s'agirait d'un degré d'assurance avec lequel une population d'articles est rendue propre par le procédé considéré (22).

La DGKH (Société allemande d'hygiène hospitalière), la DGSV (Société allemande de stérilisation hospitalière) et l'AKI (Cercle de travail pour le retraitement des instruments) se sont inspirés de la norme NF EN ISO 15883 pour élaborer un guide de validation du nettoyage et de la désinfection chimiques manuels des dispositifs médicaux en coopération avec la VAH

(Association allemande pour l'hygiène appliquée). Les critères d'acceptation pour l'évaluation de la performance du nettoyage sont présentés dans les Tableaux 1 et 2 (23) (24). Selon ce guide, tous les dispositifs médicaux souillés en conditions réelles doivent être visuellement propres et ce n'est qu'à cette condition qu'ils feront l'objet de tests semi-quantitatifs ou quantitatifs de mise en évidence de résidus protéiniques.

Tableau 1 : Critères d'acceptation pour l'évaluation de la performance du nettoyage pour les dispositifs médicaux souillés en conditions réelles

Groupe	Instruments types	Méthodologie	Valeurs de référence
1	Instruments sans articulations ni corps creux (curettes, écarteurs)	Contrôle visuel	< 10-15µg/4-5cm ²
2	Instruments avec articulations (ciseaux, pinces)	Détection au moins semi-quantitative des protéines, après élution en sachet PE	< 75µg/instrument (jusqu'à 15cm de long) < 100µg/instrument (plus de 15cm de long)
3	Instruments à tiges coulissante	- Détection quantitative des protéines, après élution de l'instrument complet en sachet PE - Elution partielle de la partie fonctionnelle, en éprouvette à l'aide d'ultrasons	< 100µg/instrument < 50µg/instrument
4	Instruments creux (instruments à gaine)	Détection quantitative, p. ex. : - Gaine d'un instrument démontable échantillonnée uniquement à l'intérieur (rinçage) - Chacune des pièces de travail, éluées p. ex. dans un tuyau fermé des deux côtés - Uniquement mors avec articulation, en éprouvette à l'aide d'ultrasons	< 75µg/instrument (gaine jusqu'à 4mm de diamètre intérieur) < 100µg/instrument (gaine de plus de 4mm de diamètre intérieur) < 50µg/pièce de travail < 40µg/mors avec articulation
5	Instruments MIC	Détection quantitative des protéines, après élution de l'instrument complet	< 50µg/instrument < 20µg/instrument (instruments ophtalmologiques)

Concernant les dispositifs d'épreuve de procédé (DEP), ou Process Challenge Device (PCD) qui sont des articles destinés à évaluer l'efficacité du procédé de nettoyage, tous doivent être visuellement exempts de toute souillure test. Seuls les DEP visuellement propres feront l'objet de tests semi-quantitatifs.

Tableau 2 : Critères d'acceptation pour l'évaluation de la performance du nettoyage pour les dispositifs d'épreuve de procédé (pince de Crile)

Critères d'acceptation	Protéines par DEP (albumine de sérum bovin (BSA))
Valeur limite	> 150µg, à ne pas atteindre ni dépasser
Valeur d'alerte	> 80 ≤ 150 µg
Valeur de référence	≤ 80 µg

- **Equipements disponibles pour le pré-nettoyage**

Pour atteindre ces seuils d'acceptation, les services de stérilisation ont recours à une étape complémentaire de pré-nettoyage pour améliorer le lavage des instruments présentant une configuration complexe et/ou des cavités difficilement accessibles (25). Les DM complexes correspondent notamment aux instruments à tige tubulaire (instruments de chirurgie mini-invasive, aspirateurs, instruments canulés, rasoirs d'arthroscopie), micro-chirurgicaux, ou flexibles (alésoirs pour le forage du canal médullaire, pinces de biopsie flexibles, pinces flexibles de préhension de corps étrangers).

Pour le pré-nettoyage les agents de stérilisation disposent de brosses souples, d'écouvillons, de seringues pour irrigation, et d'équipements mécanisés tels que le bac à ultrasons (Illustration 1) et/ou le nettoyeur à vapeur (Illustration 2) (disponible sur le marché français depuis quelques années seulement).

Illustration 1 : Bac à ultrasons



Illustration 2 : Nettoyeur à vapeur



Selon le Guide pour la maîtrise des traitements appliqués aux dispositifs médicaux réutilisables (FD S 98-135) (5), le nettoyage par appareil à ultrasons peut compléter un nettoyage manuel ou constituer un pré-nettoyage avant traitement en LD. Le principe repose sur des transducteurs qui font vibrer l'intérieur de la cuve à très haute fréquence, ce qui génère une cavitation, c'est-à-dire la formation et l'implosion de millions de petites bulles d'air dans un liquide. Ces bulles d'air dégagent une énergie considérable lorsqu'elles implosent à la surface de la pièce à nettoyer (26). Les paramètres à définir pour une utilisation optimale de cet équipement sont (27) :

- la température, entre 40°C et 45°C (risques de coagulation des protéines si >45°C)
- la fréquence, de 20 à 40 kHz (risque de détérioration du matériel si <20kHz; efficacité moindre si >40kHz)
- la qualité de l'eau
- le détergent qui favorise le décollement des souillures
- le matériau constitutif du DM

Un bac à ultrasons peut disposer d'un système d'irrigation pour les dispositifs à corps creux. L'équipement disponible au CHUGA et utilisé pour les essais ne dispose pas de ce système.

Les ondes ultrasonores sont traversantes pour le verre mais sont arrêtées par les matières plastiques (cupules) ou amorties pour les dispositifs en caoutchouc et silicone (28).

L'utilisation des ultrasons est préconisée pour les dispositifs médicaux réutilisables creux disposant d'une lumière (canules d'aspiration, alésoirs ou trocarts par exemple), pour les DM creux dont la conception ou l'utilisation rendent difficile le nettoyage manuel ou en LD. Plus spécifiquement, certaines études démontrent que les fraises dentaires traitées aux ultrasons présentent significativement moins de débris que lorsque celles-ci sont exclusivement traitées en LD (6).

Contrairement aux laveurs-désinfecteurs, les bacs à ultrasons ne disposent d'aucune réglementation opposable, mais les BPPH précisent une obligation de résultats. Du fait de l'absence de dispositif de contrôle et d'enregistrement sur le bac à ultrasons lors de son

fonctionnement, l'appréciation de ses performances doit faire l'objet d'une cartographie initiale des zones « actives » et d'un suivi régulier afin de détecter une éventuelle insuffisance ou l'absence d'efficacité. Pour cela, différentes méthodes de contrôle des performances sont proposées et réalisables à périodicité définie (8). Ainsi, comme pour les autres procédés utilisés en stérilisation centrale, l'aide au nettoyage par les ultrasons doit être validée, des contrôles de routine doivent être effectués et le personnel doit suivre une formation adaptée (29).

Le nettoyeur à vapeur, initialement conçu pour les surfaces et donnant de bons résultats en hygiène hospitalière, a récemment été élargi au marché des dispositifs médicaux. Il s'agit d'un générateur de paillasse qui envoie de la vapeur sous pression, vers un « pistolet » actionnable par un bouton et disposant de divers adaptateurs. La vapeur pénètre dans les corps creux et les anfractuosités des instruments grâce à sa nature gazeuse, sa vitesse, sa température et son humidité qui lui confèrent des propriétés décapantes. Théoriquement, les canules ayant une lumière très fine, inaccessible à l'écouvillonnage, peuvent être nettoyées avec grande efficacité, très facilement et très rapidement via cet équipement. Le nettoyeur à vapeur est un complément de lavage intéressant, mais qui s'utilise en appoint des autres techniques de pré-nettoyage. Le tableau 3 reprend les avantages et inconvénients de ce dernier (25). A cela, il faut ajouter la question du risque de coagulation des protéines lié à la haute température de la vapeur.

Tableau 3 : Avantages et inconvénients du nettoyeur à vapeur

Avantages	Inconvénients
Bonne efficacité sur DM creux	Méthode empirique
Gain de temps / US	Efficacité moindre sur DM non creux (DM à mors...)
Intégration plus facile dans le circuit des DM	Accessoires/équipements adaptés pour prévenir le risque de brûlure
Coût modéré	Dispersât de particules potentiellement contaminées
Facilité d'installation et d'utilisation	Absence de contrôle des performances

Une étude menée par le CHRU de Lille avait pour objectif d'évaluer l'efficacité du nettoyeur à vapeur pour les DM creux, en remplacement du cycle en irrigateur ultrasonique et/ou de l'écouvillonnage. L'évaluation s'est faite par observation visuelle. Les conclusions s'avèrent plus favorables en terme de temps, de coût et d'utilisation pour le nettoyeur à vapeur (30). Cependant cet équipement de pré-lavage est insuffisant à lui seul pour garantir le nettoyage correct des instruments avant stérilisation (28).

4. Les différentes méthodes de contrôle de l'étape de nettoyage

En France, les services de stérilisation des établissements de santé réalisent un simple contrôle visuel (œil nu ou loupe) pour l'évaluation de l'efficacité du nettoyage des instruments chirurgicaux. Il s'agit du seul contrôle qu'il est possible de pratiquer en routine pour des raisons techniques et budgétaires. L'incapacité à surveiller de faibles niveaux de contamination infectieuse ou protéique en routine sur les dispositifs médicaux et le risque que des agents biologiques résistants puissent rester infectieux et non détectés nous ont amenés à rechercher des solutions permettant de les contrôler.

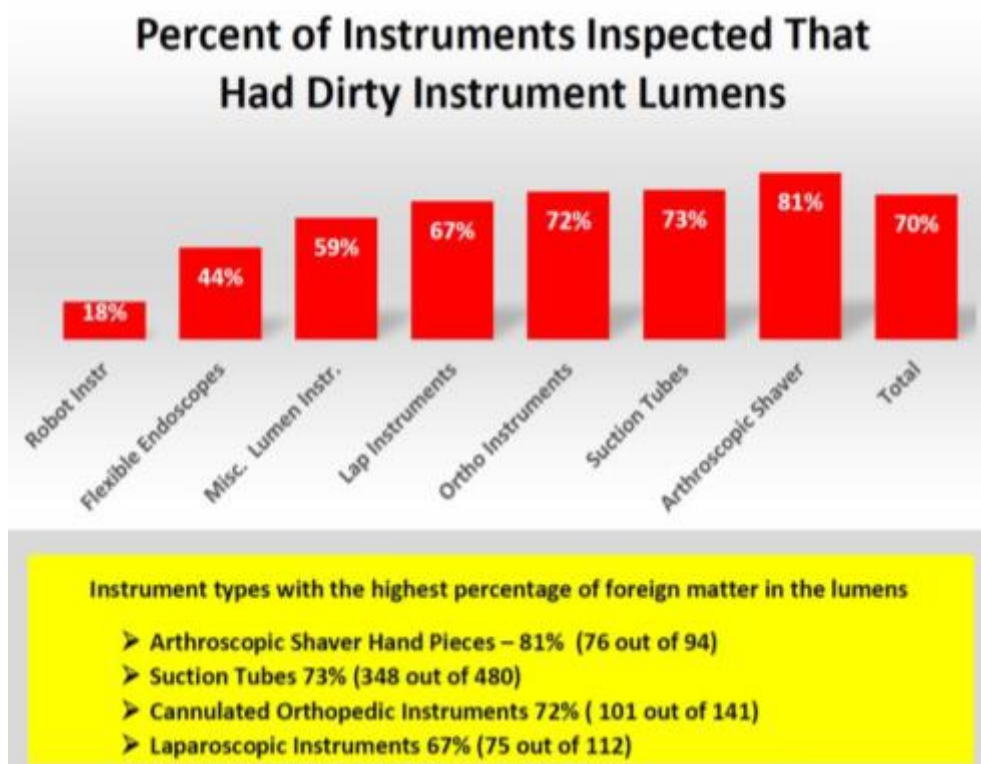
Plusieurs méthodes de contrôle de l'efficacité du lavage des dispositifs médicaux envisageables sont décrites ci-après.

- **Le contrôle visuel**

Il reste le contrôle le plus répandu mais n'est pas suffisant pour évaluer la fiabilité du procédé de nettoyage notamment pour les surfaces non accessibles.

Une étude multicentrique menée aux Etats-Unis consistait à observer différents types de dispositifs (n=860) avec une lumière allant de 1 à 2mm de diamètre interne. Un système d'inspection de lumière et canal de type caméra, a permis de constater que 70% des dispositifs étudiés présentaient des souillures (Illustration 3) (9).

Illustration 3: Etude « Multi-Center Lumen Inspection Survey » présentée à International Association of Healthcare Central Service Materiel Management (IAHCSMM) National Convention en 2015



Frédy Cavin et al ont étudié les tiges d'alésage (Illustration 4) car le bloc opératoire du CHUV de Lausanne a plusieurs fois rapporté qu'il y avait des salissures noires insérées dans les interstices de la surface extérieure, ainsi que des taches sur le support en plastique thermoformé.

Illustration 4: Alésoir composé d'un arbre flexible et d'une tête



Une optique a permis de visualiser l'intérieur de la tige d'alésage et a montré que la partie proximale était propre mais plus on approchait la partie distale, plus les saletés fixées apparaissaient (31).

- **Le contrôle par tests de souillures**

Ces tests sont choisis de manière à imiter la souillure la plus difficile à éliminer rencontrée en pratique. Le document technique de spécification (ISO / TS 15883-5), énumère 19 souillures d'essai, avec des ingrédients mal caractérisés chimiquement tel que l'œuf ou le beurre. Vingt-deux souillures d'essai différentes sont listées dans le document AAMI TIR30 2011 « Un recueil de procédés, matériaux, méthodes d'essai et critères d'acceptation pour le nettoyage des dispositifs médicaux réutilisables » (32). Actuellement, les souillures disponibles dans le commerce sont souvent vendues sous forme de poudre à reconstituer avec de l'eau, ce qui peut rendre la souillure finalement plus facile à enlever, ne posant pas le défi raisonnable de la pire condition de nettoyage d'un dispositif. D'ailleurs, le développement, l'application, et la validation des souillures d'essai pour le nettoyage ne sont pas bien établis.

- **Les bio-indicateurs**

Ils sont accompagnés ou non de souillures tests et le germe test est l'*Enterococcus faecium* ATCC 6057 (bactérie thermorésistante) dont il convient d'obtenir une réduction de 5log10.

- **Les modèles d'échantillon à fente ou de simulation de cavités**

Ils sont utiles pour contrôler l'effet nettoyant des instruments à lumière étroite et simuler les zones à problèmes. Ce système-test est composé d'un échantillon en acier inox à l'intérieur duquel se trouve une souillure-test standardisée similaire à du sang humain.

- **La méthode par bioluminescence – ATPmétrie**

C'est un procédé photométrique lors duquel, la luciférase, permet d'estimer la quantité restante d'ATP (adénosine triphosphate) qui est un nucléotide présent en grande quantité dans le sang humain et utilisé comme marqueur des souillures. Des dispositifs prêts à l'emploi et utilisant cette technique sont commercialisés et disponibles en France.

- **Le dosage protéique**

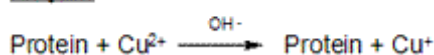
Il existe de nombreuses méthodes de dosage des protéines tel que le test à la ninhydrine, la

méthode OPA (o-phthaldialdéhyde) qui est une méthode photométrique et la méthode de Biuret qui est une détermination semi-quantitative des protéines. Des dispositifs prêts à l'emploi utilisant le test à la ninhydrine ou la méthode de Biuret sont également commercialisés et disponibles en France.

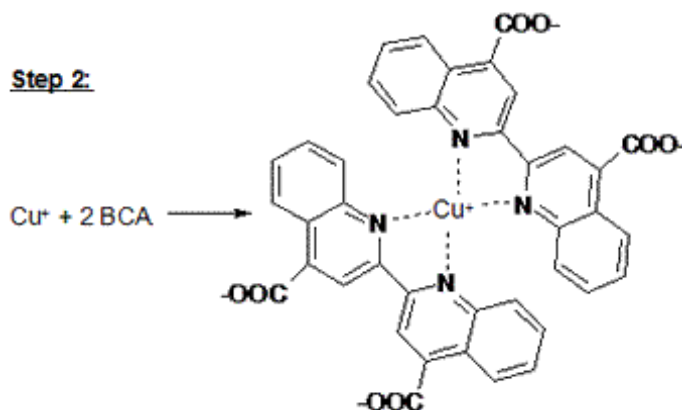
Le choix d'un dosage protéique au laboratoire, et plus particulièrement en Recherche & Développement, se ramène le plus souvent à deux types de tests colorimétriques. Ceux qui utilisent un colorant qui se fixe sur les protéines en changeant de couleur, ont pour tête-de-file la méthode au bleu de Coomassie développée par Bradford (1951). Les méthodes mettant en œuvre la réduction de l'ion Cu(II) par les liaisons peptidiques des protéines, reposent sur la méthode à l'acide bicinchoninique, plus connue sous l'acronyme BCA (33). La méthode BCA a été inventée par Paul K. Smith en 1985 chez Pierce Chemical Company, le distributeur majeur de ce kit (34)(35). Le principe de la méthode BCA repose sur le fait que les protéines réduisent l'ion cuivrique Cu (II) en ion cuivreux Cu (I) en milieu alcalin. L'acide bicinchoninique (BCA) est un réactif colorigène hautement spécifique pour le Cu (I), qui forme un complexe pourpre ayant une absorption optique maximale à 562nm (Illustration 5) (36).

Illustration 5 : Etapes réactionnelles de la méthode au BCA

Step 1:



Step 2:



Au-delà de ces méthodes de contrôle, l'étape de nettoyage passe par des méthodes d'aide aux décisions de maîtrise des risques. Par exemple la cartographie des risques, définie comme la représentation structurée d'un ensemble de risques identifiés et quantifiés dans un périmètre donné, permet une analyse prévisionnelle des risques liés au nettoyage. Cette analyse est réalisée via la méthode d'Analyse des Modes de Défaillances, de leurs Effets et de leur Criticité (AMDEC). Des moyens de maîtrise sont alors proposés dans le but de diminuer chaque risque identifié. C'est un outil visuel pour donner au lecteur de la cartographie une image immédiate de la situation (37).

Le suivi quotidien des non-conformités vient compléter cet outil. Il est l'un des piliers du système d'amélioration continue de la qualité. Il permet notamment de recenser les points non conformes aux exigences du processus de nettoyage et d'en définir les actions préventives ou correctives à mettre en œuvre.

Au Centre Hospitalier Universitaire de Grenoble Alpes, nous avons à notre disposition deux équipements mécanisés pour le pré-nettoyage des DM : le bac à ultrasons et le nettoyeur à vapeur. La propreté des DM est contrôlée visuellement (œil nu ou loupe) à l'issue du nettoyage. Cependant, nous sommes régulièrement confrontés au risque d'envoyer à l'étape de stérilisation, un DM pour lequel ce contrôle s'avère insuffisant. L'évaluation de l'efficacité des deux équipements de pré nettoyage (bac à ultrasons (US) versus le nettoyeur à vapeur (NV)), voire définir la supériorité de l'un par rapport à l'autre, s'avère donc nécessaire.

B. Objectif

L'objectif de notre étude est de comparer l'efficacité du pré-nettoyage avec le nettoyeur à vapeur à celle du bac à ultrasons pour la validation du processus de nettoyage des dispositifs médicaux à corps creux, par la méthode au BCA. L'étude consiste à souiller des dispositifs médicaux avec du sang humain, puis d'appliquer strictement la procédure institutionnelle de nettoyage des DM (cf annexe 1), pour doser le taux de protéines résiduelles totales en sortie de LD par la méthode au BCA (BiCinchoninic acid Assay).

Le second objectif est de réaliser des tests en situation défavorable, ou « worst-case » pour évaluer l'impact des écarts de procédures rencontrés en pratique.

II. MATERIELS & METHODES

A. Choix des dispositifs d'épreuve de procédé

Les dispositifs d'épreuve de procédé (DEP) sélectionnés pour l'étude sont, d'une part, des plaques en inox représentatives des DM qualifiés de « standards » en raison d'une simplicité de prise en charge à l'étape de nettoyage. Et d'autre part, nous avons choisi des DM qualifiés de « complexes » car difficiles à prendre en charge à l'étape de nettoyage, et correspondant à des:

- canules écouvillonnables (CE) de 2,8mm de diamètre interne et 95mm de long (Illustration 6a)
- canules non écouvillonnables (CNE) de 0,6mm de diamètre interne et 115mm de long (Illustration 6b)

Ces 3 types de DM sont composés d'acier inoxydable.

Illustration 6a : Canule écouvillonnable et écouvillon adapté



Illustration 6b : Canule non écouvillonnable



B. Choix de la souillure

La souillure sélectionnée pour l'étude correspond à du sang humain provenant d'un sujet sain de sexe féminin et dont la concentration protéique théorique est comprise entre 185g/L et

240g/L, puisque les valeurs normales de l'hémoglobine et des protéines plasmatiques sont respectivement de 120-160g/L et 65-80g/L (38).

C. Validation de la méthode de dosage des protéines résiduelles totales au BCA

1. Validation de la linéarité du kit

En phase préliminaire aux essais, nous avons validé la linéarité du kit BCA avec le standard BSA (bovin serum albumin) fourni et selon les recommandations du fournisseur du kit (Merck Millipore).

2. Validation de la méthode dans les conditions expérimentales

Nous avons validé la méthode de dosage au BCA dans les conditions expérimentales, c'est-à-dire avec du sang humain dilué dans 20ml de dodécylsulfate de sodium (SDS) 0,1%, NaCl 0,9%. Pour cela, nous nous sommes inspirés de la ligne directrice de l'ICH Q2(R1), couramment appliquée à l'évaluation des substances médicamenteuses, pour adapter la validation de méthode aux dispositifs médicaux et à la méthode employée (39).

La méthode de dosage protéique décrite est réalisée avec du sang humain et pour des soucis de compréhension les résultats seront discutés en termes de résidus protéiques et non de résidus sanguins.

▪ Caractéristiques évaluées

Pour la validation de la méthode de dosage des protéines résiduelles totales au BCA, nous avons évalué la linéarité, l'exactitude, la fidélité et la fidélité intermédiaire. D'après la liste des substances compatibles avec le kit BCA (Tableau 15 page 51), la solution d'éluion au SDS

0.1%, NaCl 0.9% n'entraîne théoriquement pas d'interférence. C'est avec cette matrice que la méthode a été évaluée.

Une gamme de 5 volumes de sang (80 μ L, 90 μ L, 100 μ L, 110 μ L et 120 μ L), déposés dans 20mL de SDS 0.1%, NaCl 0.9% chacun, est réalisée et répétée 3 jours différents pour l'évaluation de la linéarité (cf annexe 2).

Un échantillon homogène (100 μ L de sang dans 20mL de SDS 0.1%, NaCl 0.9%) est utilisé pour réaliser l'évaluation de la fidélité (et fidélité intermédiaire). Ainsi, 3 groupes de mesures correspondant à des conditions de fidélité intermédiaire (même laboratoire) sont réalisés. A l'intérieur de chaque groupe, 5 essais indépendants sont produits dans des conditions de répétabilité (même laboratoire, même opérateur, même équipement, intervalle de temps court) pour l'évaluation de la fidélité.

- **Détermination de la concentration protéique dans l'échantillon de sang humain utilisé pour les essais**

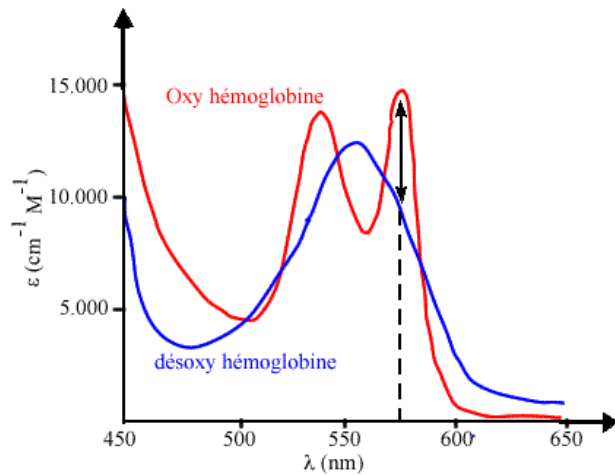
La concentration protéique réelle du sang humain utilisé pour les essais est déterminée par la méthode des ajouts dosés. Le principe revient à ajouter des volumes connus d'un étalon de concentration connue (standard BSA à 2mg/ml) dans l'échantillon pour modifier la sensibilité de la méthode. La connaissance de la concentration protéique réelle dans cet échantillon de sang nous permettra de déduire la quantité de protéines résiduelles sur les DM à partir de leur mesure d'absorbance à 562nm.

- **Evaluation de l'impact de la filtration de l'échantillon sur l'absorbance à 562nm**

Durant la phase préliminaire, nous nous sommes intéressés à l'impact qu'avaient les composants du sang et plus particulièrement les globules rouges sur les résultats d'absorbance. En effet, d'après le Graphique 1 qui illustre le spectre d'absorption dans l'ultraviolet/visible de

l'hémoglobine sous sa forme libre (désoxy) et sa forme saturée (oxy), l'hémoglobine est susceptible de présenter une absorbance à 562nm (40).

Graphique 1 : Spectre d'absorption de l'hémoglobine sous sa forme libre et saturée



Pour évaluer cet impact, nous avons mesuré l'absorbance à 562nm de cinq échantillons de même concentration (100µL de sang dans 20mL de SDS 0,1% NaCl 0,9%), avec et sans filtration à 0,22µm, puis avec filtration et incubation à 37°C pendant 30 minutes avec le réactif BCA, sachant que le diamètre d'un globule rouge est de 7µm. Les moyennes de chaque groupe (n=3) seront comparées. Le groupe d'échantillons "avec filtration et incubation" permet d'apprécier la différence d'absorbance par rapport aux deux autres groupes d'échantillons non incubés.

D. Conditions expérimentales

Tous les DM de l'étude sont soumis à un contrôle visuel à l'oeil nu avant la réalisation du dosage des protéines résiduelles totales au BCA.

1. Etude expérimentale réalisée avec du sang prélevé sur tube hépariné

Le plan expérimental décrit ci-après est résumé en étapes clés dans la Figure 2. Le plan

d'échantillonnage est décrit dans la Figure 3.

- **Plaques en inox**

Trente plaques en inox sont souillées avec environ 100µL de sang prélevé sur tube hépariné et chaque souillure est pesée. Chaque plaque est ensuite prise en charge selon les étapes décrites dans la procédure institutionnelle : immersion dans un bac de pré-désinfection avec détergent-désinfectant (Salvanios pH7 0,5%) pendant 15 minutes à température ambiante, rinçage à l'eau, puis passage direct en LD durant un cycle de 1h15 (cycle instrument sans support coelioscopie, valable pour l'ensemble des DM de l'étude) (Figure 3). Cette méthode de nettoyage correspondant à la méthode 1 de la Figure 3 est la méthode de référence de l'étude.

- **Canules écouvillonnables (CE)**

Quatre-vingt-dix canules écouvillonnables sont souillées avec environ 100µL de sang prélevé sur tube hépariné et chaque souillure est pesée. Chaque canule est ensuite prise en charge selon les étapes décrites dans la procédure institutionnelle : irrigation des canules avec 2mL d'eau déminéralisée dans les 10 minutes qui suivent le dépôt de la souillure (simulation de l'irrigation per-opératoire), immersion dans un bac de pré-désinfection avec détergent-désinfectant (Salvanios pH7 0,5%) pendant 15 minutes à température ambiante, écouvillonnage, rinçage à l'eau, puis selon trois méthodes de lavage (Figure 3) différentes :

1. 30 canules avec passage direct en LD (1h15)
2. 30 canules avec pré-nettoyage dans le bac à US (5 minutes) puis passage en LD (1h15)
3. 30 canules avec pré-nettoyage au NV (5 à 10 secondes) puis passage en LD (1h15)

- **Canules non écouvillonnables (CNE)**

Quatre-vingt-dix canules non écouvillonnables sont souillées avec environ 100µL de sang prélevé sur tube hépariné et chaque souillure est pesée. Chaque canule est ensuite prise en charge selon les étapes décrites dans la procédure institutionnelle : irrigation des canules avec 2mL d'eau déminéralisée dans les 10 minutes qui suivent le dépôt de la souillure (simulation de

l'irrigation per-opératoire), immersion dans un bac de pré-désinfection avec détergent-désinfectant (Salvanios pH7 0,5%) pendant 15 minutes à température ambiante, rinçage à l'eau, puis selon trois méthodes de lavage (Figure 3) différentes :

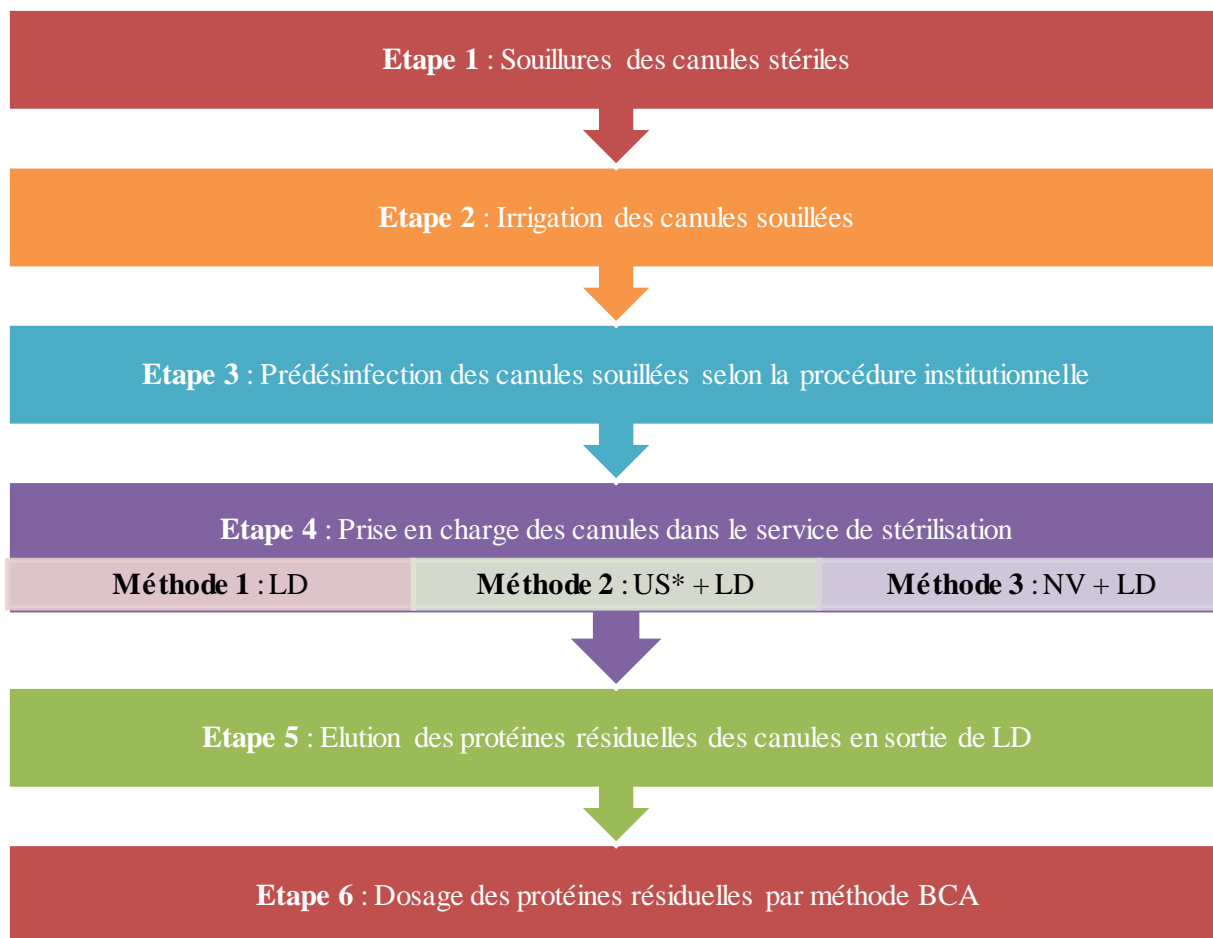
1. 30 canules avec passage direct en LD (1h15)
2. 30 canules avec pré-nettoyage dans le bac à US (5 minutes) puis passage en LD (1h15)
3. 30 canules avec pré-nettoyage au NV (5 à 10 secondes) puis passage en LD (1h15)

Chaque canule et plaque en inox est récupérée en sortie de LD et placée dans un tube à essai en verre contenant 20 mL d'une solution d'élution des protéines au SDS 0,1% et NaCl 0,9%. Celui-ci subit trois cycles successifs dans un bac à ultrasons (5 minutes à 35kHz chacun) et d'une agitation manuelle durant 5 minutes, dans le but de décrocher les protéines résiduelles du support du dispositif médical.

En parallèle, une CE, une CNE et une plaque en inox sont souillées avec 100 μ L de sang est directement placées chacune dans un tube à essai contenant 20mL de solution de décrochage qui est ensuite placé avec les autres tubes dans le bac à ultrasons pour l'étape d'élution et de décrochage des protéines résiduelles. Ces échantillons correspondent aux témoins positifs 100% et permettent d'évaluer le rendement de l'étape d'élution.

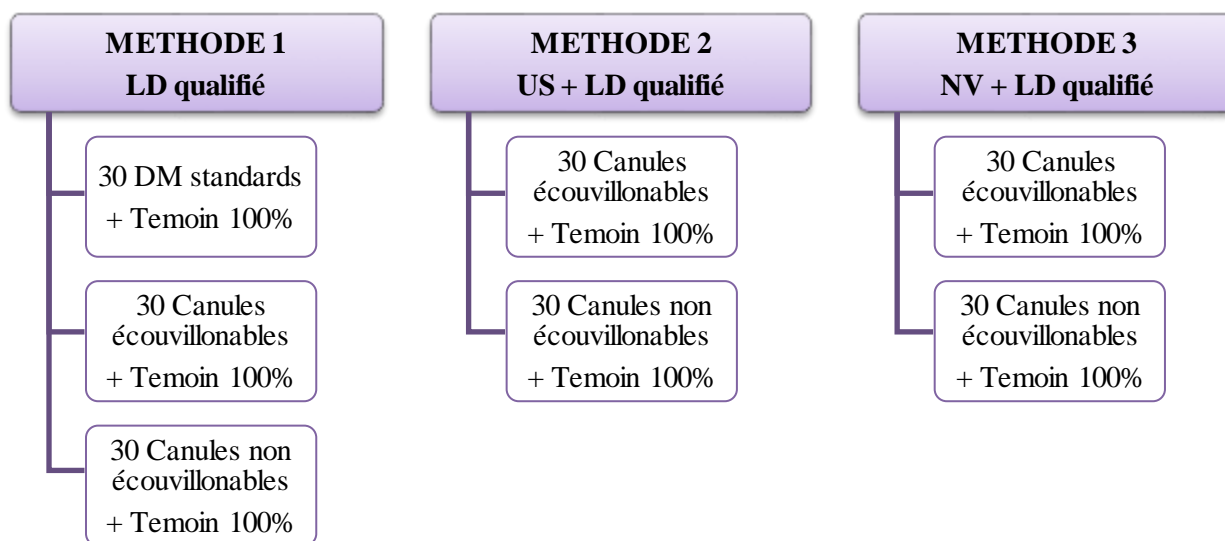
Après homogénéisation, l'absorbance des échantillons et des témoins 100% est mesurée au spectrophotomètre à 562nm.

Figure 2 : Plan expérimental résumant les étapes clés d'un essai avec CE ou CNE



*bac à ultrasons : cycle de 5 minutes qualifié au CHUGA, dépourvu de raccords d'irrigation

Figure 3 : Plan d'échantillonnage des trois méthodes de nettoyage envisagées après l'étape de pré-désinfection



D'après la notice technique du fournisseur, le kit BCA utilisé pour déterminer la quantité protéique résiduelle des DEP présente une limite inférieure de quantification théorique à 20µg/mL. Le DEP étant placé dans 20mL de SDS 0,1%, NaCl 0,9%, la limite de quantification théorique est ramenée à 400µg/DM.

2. Etude expérimentale réalisée avec du sang prélevé sur tube sec

L'étude expérimentale réalisée avec du sang humain prélevé sur tube sec est strictement identique à celle décrite dans le paragraphe D. 1. précédent (Figure 2 et 3).

3. Etude expérimentale réalisée avec du sang prélevé sur tube sec et en situation défavorable

Le deuxième objectif de l'étude consistait à réaliser des tests en situation défavorable, ou « worst-case » pour évaluer l'impact des écarts de procédure rencontrés en pratique. Nous nous sommes appuyés sur la cartographie des risques du processus de stérilisation pour identifier les situations particulièrement défavorables (en bleu dans le Tableau 4) à la bonne prise en charge des dispositifs médicaux jusqu'à l'étape de lavage en LD. Cette analyse a permis d'évaluer la pertinence des moyens de maîtrise proposés dans le Tableau 5. La situation la plus à risque et la plus fréquemment rencontrée, notamment en fin de journée et les veilles de week-end (unités de stérilisation fermée à partir de 21h et tous les dimanches), correspond à la dessiccation des souillures.

Ainsi, les séries d'essais avec étape de dessiccation reprend le plan expérimental et le plan d'échantillonnage détaillés dans le paragraphe D. 1. (Figure 2 et 3).

Tableau 4 : Evaluation de chaque étape du processus « pré-désinfection » par la méthode AMDEC

DESCRIPTION DESCRIPTION DU RISQUE	RISQUES BRUTS		
	GRAVITE	FREQUENCE	CRITICITE
(Libellé court)	- Mineure (1) - Significative (2) - Grave (3) - Critique (4) - Dramatique (5)	- Rare (1) - Peu fréquent (2) - Possible (3) - Fréquent (4) - Très fréquent (5)	- Faible (1 à 4) - Modérée (5 à 8) - Forte (9 à 12) - Majeure > 12
Fiche de liaison bloc-stérilisation / bon de commande DM absent	1	5	5
Pour acte à risque prion : Catégorie de patients ("suspect ou atteint" versus "standard ou non interrogeable") : non renseignée	3	4	12
Pour acte à risque prion : Catégorie de patients ("suspect ou atteint" versus "standard ou non interrogeable") : renseignée mais éronnée	3	1	3
Catégorie d'acte erronée ("FL acte à risque prion" à la place de "FL standard")	1	4	4
Catégorie d'acte erronée ("FL standard" à la place de "FL acte à risque prion")	3	4	12
Etiquettes de tracabilité du DM non collées sur la fiche de liaison	2	4	8
Informations étapes de prédésinfection non renseignées (trempage, rinçage, numéro de plaquettes, etc.)	1	5	5
Absence de tri des DM d'une intervention / Tri mal effectué	2	5	10
DM non ou mal prédésinfectés (présence de résidus organiques)	3	5	15
DM démontables non démontés	3	5	15
DM creux non irrigués	3	5	15
DM manquants non signalés/identifiés	2	5	10
Quantité de DM non conforme au bon de commande	1	5	5
Type de DM non conforme au bon de commande	2	4	8
DM défectueux non signalés/identifiés sur fiche de liaison + lien noir	3	4	12
DM perdu (drapage opératoire, poubelle, siphon...)	3	4	12
Absence isolement des DM le nécessitant (petites pièces, etc.)	2	5	10
Demande de traitement en urgence d'un DM non formulée	3	2	6
DM à traiter en urgence non isolé /non identifié	2	5	10
Erreur acheminement armoire / caisse en stérilisation	2	3	6
Retard acheminement armoire en stérilisation	2	5	10

Tableau 5 : Moyens de maîtrise des étapes du processus « pré-désinfection » précédemment sélectionnées dans le Tableau 4

DESCRIPTION DU RISQUE	DESCRIPTION DES DISPOSITIFS DE MAÎTRISE DU RISQUE	NATURE	TYPE	FREQUENCE	PERTINENCE	FIABILITE DE REALISATION	SUPERVISION	TRACABILITE	EVALUATION
		Détectif Préventif	Manuel Automatique Semi-Auto	Régulier Irrégulier	Oui (1) Partiellement (0,5) Non (0)	Oui (1) Partiellement (0,5) Non (0)	Oui (1) Partiellement (0,5) Non (0)	Oui (1) Partiellement (0,5) Non (0)	Note de 0 à 4
DM non ou mal prédésinfectés (présence de résidus organiques)	* Contrôle lors de la prise en charge des DM en zone de lavage * Contrôle de la propreté des DM en reposition	Détectif	Manuel	Régulier	1	1	0,5	0,5	3,0
DM creux non irrigués	* Ecouvillonnage et irrigation systématique des DM creux au lavage * Contrôle de la propreté des DM en reposition	Préventif	Manuel	Régulier	1	0,5	0,5	0,5	2,5
Retard acheminement armoire en stérilisation	* Existence d'une équipe logistiqe dédiée	Préventif	Manuel	Régulier	0,5	0,5	0,5	1	2,5

III. RESULTATS

A. Validation de la méthode de dosage des protéines résiduelles totales au BCA

1. Validation de la linéarité du kit

Les résultats des mesures d'absorbance réalisées pour l'évaluation de la linéarité du kit BCA avec l'étalon standard BSA fourni sont présentés dans le Tableau 6.

Tableau 6 : Résultats des mesures d'absorbance pour l'évaluation de la linéarité du kit BCA avec l'étalon standard BSA fourni

CONCENTRATION BSA ($\mu\text{g/ml}$)	ABSORBANCE (562nm)
25	0,02154
125	0,18489
250	0,36469
500	0,69027
1000	1,34499

2. Validation de la méthode dans les conditions expérimentales

- **Caractéristiques évaluées**

Les résultats des mesures d'absorbance réalisées pour l'évaluation de la linéarité de la méthode de dosage protéique en conditions expérimentales sont présentés dans le Tableau 7.

Tableau 7 : Données utilisées pour l'évaluation de la linéarité de la méthode de dosage protéique au BCA en conditions expérimentales

Groupe i	Essai j	Données brutes		Données normalisées	
		Poids x_j	Absorbance y_{ij}	Poids x_j	Absorbance y_{ij}
1	1	79,7	0,70139	79,4333333	0,699561218
1	2	79,3	0,68671	79,4333333	0,687624391
1	3	79,3	0,73344	79,4333333	0,734354391
2	1	90	0,7797	90,4	0,782443173
2	2	91,5	0,76402	90,4	0,756476275
2	3	89,7	0,80659	90,4	0,811390552
3	1	101,5	0,86186	100,366667	0,854087677
3	2	100	0,83922	100,366667	0,841734575
3	3	99,6	0,87859	100,366667	0,883847748
4	1	109,9	0,92956	110	0,930245793
4	2	110	0,90381	110	0,90381
4	3	110,1	0,94293	110	0,942244207
5	1	121,2	0,98359	120,9	0,98153262
5	2	121,1	0,96628	120,9	0,964908414
5	3	120,4	1,01832	120,9	1,021748966

Les résultats collectés pour l'évaluation de l'exactitude de la méthode de dosage protéique en conditions expérimentales sont présentés dans le Tableau 8.

Tableau 8 : Données utilisées pour l'évaluation de la l'exactitude de la méthode de dosage protéique au BCA en conditions expérimentales

Groupe	Groupe/Essai	Q. introduite (poids)	Surf.= y_{ij} (absorbance)	% Recouv. R_{ij}	Moyenne des recouvrements
1	1	79,7	0,70139	98,93378725	99,47918173
1	2	79,3	0,68671	99,74779091	
1	3	79,3	0,73344	99,75596703	
2	1	90	0,7797	100,1608559	99,67484381
2	2	91,5	0,76402	98,82255535	
2	3	89,7	0,80659	100,0411202	
3	1	101,5	0,86186	100,4872831	100,8420373
3	2	100	0,83922	101,4362525	
3	3	99,6	0,87859	100,6025762	
4	1	109,9	0,92956	101,6914183	100,668873
4	2	110	0,90381	100,8145012	
4	3	110,1	0,94293	99,50069947	
5	1	121,2	0,98359	98,63988462	99,28567987
5	2	121,1	0,96628	99,1289512	
5	3	120,4	1,01832	100,0882038	

Les résultats des mesures d'absorbance réalisées pour l'évaluation de la fidélité de la méthode de dosage protéique en conditions expérimentales sont présentés dans le Tableau 9.

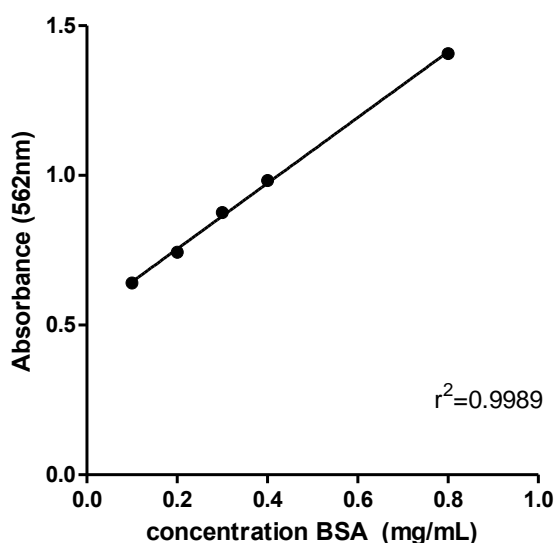
Tableau 9 : Données utilisées pour l'évaluation de la fidélité de la méthode de dosage protéique au BCA en conditions expérimentales

Groupe	Essai	Q. introduite (poids)	Surf.=yij (absorbance)	Q. Recouvrée
1	1	100,477	0,85254	100,6503818
1	2	102,71	0,87154	103,3907252
1	3	97,161	0,82454	96,61198088
1	4	83,099	0,70754	79,73723434
1	5	99,753	0,84654	99,78501014
1	6	101,5	0,86186	101,9945923
2	1	100,301	0,83192	100,3671117
2	2	100,764	0,83592	100,9529423
2	3	100,095	0,82992	100,0741965
2	4	103,119	0,85492	103,7356374
2	5	103,217	0,85592	103,882095
2	6	100	0,83922	101,4362525
3	1	101,889	0,88869	101,6679317
3	2	105,281	0,91869	106,0276322
3	3	101,26	0,88369	100,941315
3	4	102,883	0,89769	102,9758418
3	5	105,368	0,91869	106,0276322
3	6	101,6	0,87859	100,2001659

- **Détermination de la concentration protéique dans l'échantillon de sang humain utilisé pour les essais**

La méthode des ajouts dosés a permis de déterminer la concentration protéique du sang utilisé pour les essais par l'établissement de l'équation de la droite suivante : $y = 1,097 x + 0,5347$ (Graphique 2).

Graphique 2 : Droite obtenue par la méthode des ajouts dosés pour la détermination de la concentration protéique de l'échantillon de sang humain utilisé



- **Evaluation de l'impact de la filtration de l'échantillon sur l'absorbance à 562nm**

Les résultats d'absorbance des 5 échantillons homogènes avec ou sans filtration et avec filtration et incubation avec le réactif BCA sont présentés dans le tableau 10.

Tableau 10 : Valeurs d'absorbance des 5 échantillons homogènes des 3 groupes d'essai pour la détermination de l'effet de filtration

Groupes d'essai	Absorbance (562nm)				
Echantillons non filtrés + non incubés	0.348	0.355	0.366	0.349	0.356
Echantillons filtrés + non incubés	0.345	0.354	0.36	0.347	0.352
Echantillons filtrés + incubés avec réactif	1,0149	1,06005	1,02042	1,02717	1,03658

B. Conditions expérimentales

1. Etude expérimentale avec du sang prélevé sur tube hépariné

Les essais avec du sang prélevé sur tube hépariné n'ont été réalisés que pour 30 CE et 30 CNE et selon la méthode 1. Les raisons justifiant le dimensionnement de ces échantillons seront décrites dans la partie Discussion.

- **Canules écouvillonnables (CE)**

Le dépôt de sang moyen dans les canules est de 101,54mg, IC 95% [101,01 ; 102,06]. Au contrôle visuel, nous constatons l'absence de souillures résiduelles visibles pour les 30 CE.

Les résultats des mesures d'absorbance sont présentés dans le Tableau 11.

Tableau 11 : Résultats des mesures d'absorbance des échantillons de CE traités en LD

Numéro d'échantillon	Absorbance (562nm)	Numéro d'échantillon	Absorbance (562nm)
1	0.004	17	-0.060
2	-0.025	18	-0.008
3	-0.011	19	-0.048
4	-0.006	20	-0.053
5	-0.020	21	-0.042
6	-0.027	22	-0.021
7	-0.027	23	-0.008
8	-0.043	24	-0.054
9	-0.042	25	-0.047
10	-0.038	26	-0.045
11	-0.052	27	-0.051
12	-0.055	28	-0.042
13	-0.018	29	-0.028
14	-0.049	30	-0.101
15	-0.018	témoin 100%	1.596
16	-0.028		

- **Canules non écouvillonnables (CNE)**

Le dépôt de sang moyen dans les canules est de 99,2mg, IC 95% [96,95 ; 101,75]. Au contrôle visuel, nous constatons l'absence de souillures résiduelles visibles pour les 30 CNE. Les résultats des mesures d'absorbance sont présentés dans le Tableau 12.

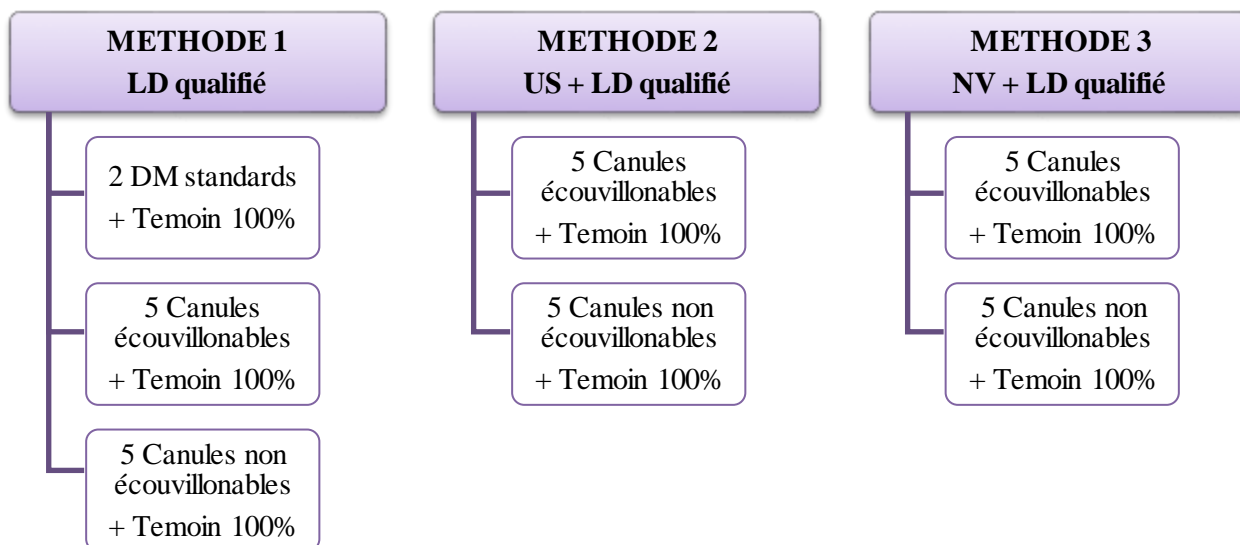
Tableau 12 : Résultats des mesures d'absorbance des échantillons de CNE traitées en LD

Numéro d'échantillon	Absorbance (562nm)	Numéro d'échantillon	Absorbance (562nm)
1	0.011	17	-0.010
2	0.010	18	-0.016
3	0.004	19	-0.014
4	0.206	20	-0.004
5	0.004	21	-0.007
6	-0.005	22	-0.017
7	-0.001	23	-0.015
8	-0.007	24	-0.013
9	-0.007	25	-0.004
10	-0.008	26	-0.010
11	-0.019	27	-0.003
12	-0.012	28	-0.016
13	-0.004	29	-0.002
14	-0.011	30	-0.005
15	-0.015	témoin 100%	1.346
16	-0.039		

2. Etude expérimentale avec du sang prélevé sur tube sec

Pour des raisons d'ordre logistique, le plan d'échantillonnage a été réduit à 5 échantillons par série d'essais pour les CE et CNE (Figure 4). Celui-ci est identique pour la série d'essai sans étape de dessiccation et avec étape de dessiccation.

Figure 4 : Plan d'échantillonnage des trois méthodes de nettoyage envisagées après l'étape de pré-désinfection modifié (avec et sans étape de dessiccation des souillures)



Ainsi, pour une meilleure compréhension, les résultats des séries d'essais réalisées avec du sang prélevé sur tube sec, sans étape de dessiccation et avec étape de dessiccation, seront présentés conjointement ci-dessous.

- **Essais avec passage en LD sans pré-nettoyage au bac à US ou NV**

Le dépôt de sang moyen dans les CE est de 106,03mg, IC 95% [104,25 ; 107,75] et de 103,08mg, IC 95% [101,82 ; 104,18] pour les CNE. Au contrôle visuel, nous constatons la présence de souillures résiduelles pour toutes les CNE. En revanche, il n'y a pas de résidus protéiques observés sur les CE et les DM standards (plaque en inox). Les résultats des mesures d'absorbance des échantillons sont présentés dans le Tableau 13.

Tableau 13 : Résultats des mesures d'absorbance des échantillons de CE, CNE et DM standards traitées en LD

Type d'échantillon	Numéro d'échantillon	Absorbance (562nm)
Canule écouvillonnable (ø 2,8mm) Sang séché LD	1	0,019
	2	-0,005
	3	NE
	4	-0,001
	5	0,018
	témoin 100%	1,08
Canule écouvillonnable (ø 2,8mm) Sang non séché LD	1	NE
	2	0,021
	3	0,009
	4	0,003
	5	0,019
	témoin 100%	0,949
Canule non écouvillonnable (ø 0,6mm) Sang séché LD	1	0,183
	2	0,059
	3	0,116
	4	0,064
	5	NE
	témoin 100%	0,307
Canule non écouvillonnable (ø 0,6mm) Sang non séché LD	1	0,054
	2	0,055
	3	NE
	4	0,042
	5	0,035
	témoin 100%	0,802
Plaque inox Sang séché LD	1	0,00408
	2	-0,004
	témoin 100%	0,828
Plaque inox Sang non séché LD	1	0
	2	0,02
	témoin 100%	1,362

- **Essais avec passage en LD incluant l'étape de pré-nettoyage avec le nettoyeur à vapeur ou le bac à ultrasons**

Le dépôt de sang moyen dans les CE est de 107,94mg, IC 95% [106,70 ; 109,18] et de 100,38mg, IC 95% [93,95 ; 106,81] pour les CNE. Au contrôle visuel, seules les CNE pré-nettoyées dans le bac à ultrasons (avec ou sans étape de dessiccation) présentent des souillures. Les autres canules ne présentent pas de souillures résiduelles visibles à l'oeil nu. Les résultats des mesures d'absorbance des échantillons sont présentés dans le Tableau 14.

Tableau 14 : Résultats des mesures d'absorbance des échantillons de CE et CNE nettoyés au US+LD ou NV+LD

Type d'échantillon	Numéro d'échantillon	Absorbance (562nm)
Canule écouvillonnable (ø 2,8mm) Sang séché US+LD	1	-0,00492
	2	0,00208
	3	-0,00692
	4	-0,00092
	5	-0,006
	témoin 100%	1,231
Canule écouvillonnable (ø 2,8mm) Sang non séché US+LD	1	-0,00392
	2	-0,00892
	3	0,01908
	4	-0,01692
	5	-0,002
	témoin 100%	1,354
Canule écouvillonnable (ø 2,8mm) Sang séché NV+LD	1	0,02808
	2	0,02408
	3	0,00508
	4	-0,00092
	5	0,005
	témoin 100%	1,231
Canule écouvillonnable (ø 2,8mm) Sang non séché NV+LD	1	0,02108
	2	-0,00492
	3	0,00408
	4	0,01508
	5	0,01
	témoin 100%	1,354
Canule non écouvillonnable (ø 0,6mm) Sang séché US+LD	1	0,24608
	2	0,29808
	3	0,20508
	4	0,30008
	5	0,121
	témoin 100%	1,104
Canule non écouvillonnable (ø 0,6mm) Sang non séché US+LD	1	0,51508
	2	0,36508
	3	0,16208
	4	0,13208
	5	0,209
	témoin 100%	1,081
Canule non écouvillonnable (ø 0,6mm) Sang séché NV+LD	1	0,02308
	2	0,00208
	3	0,12908
	4	0,15908
	5	0,035
	témoin 100%	1,104
Canule non écouvillonnable (ø 0,6mm) Sang non séché NV+LD	1	0,03108
	2	0,00508
	3	0,00308
	4	0,02108
	5	NE
	témoin 100%	1,08

IV. DISCUSSION

L'objectif de notre étude est de comparer l'efficacité du pré-nettoyage avec le nettoyeur à vapeur à celle du bac à ultrasons pour la validation du processus de nettoyage des dispositifs médicaux à corps creux par la méthode au BCA.

A. Choix des dispositifs d'épreuve de procédé

Chaque année, près de 3 800 000 dispositifs médicaux sont stérilisés au CHUGA. La maîtrise de cette activité passe par le suivi quotidien des non-conformités. Nous avons ainsi pu répertorier le nombre de non-conformités signalant la présence de résidus sur un dispositif médical, détectés soit après le cycle de lavage, à l'étape du conditionnement, soit après l'étape de stérilisation, au bloc opératoire. Une analyse de janvier 2015 à juin 2016 (n=2760 non-conformités enregistrées) indique que ce type de non-conformités représente 1,27% de l'ensemble des non-conformités (35/2760). Parmi les 35 non-conformités (présence de résidus) répertoriées, 65,7% étaient déclarées par le bloc opératoire donc découvertes à l'ouverture du conditionnement, au moment de l'utilisation des DM.

Les dispositifs médicaux concernés correspondent majoritairement à des pinces bipolaires (6) et à des dispositifs médicaux à corps creux (12), dont la moitié correspond à des canules d'aspiration (6). D'après les déclarations de non-conformités, il s'agissait de souillures à base de sang, de résidus osseux ou autres tissus humains. Les canules d'aspiration sont spécialement conçues pour les interventions microchirurgicales en neurochirurgie et en chirurgie ORL. Elles peuvent toutefois être utilisées dans de nombreuses autres disciplines, telles que la chirurgie bucco-maxillaire et faciale, la chirurgie de la colonne vertébrale ou la chirurgie cardio-thoracique. Les canules d'aspiration sont disponibles avec plusieurs diamètres de tube d'aspiration, plusieurs longueurs, plusieurs dispositions de la plaque de prise et des interrupteurs d'aspiration. Les canules choisies pour l'étude étaient écouvillonnables pour certaines, non

écouvillonnables pour d'autres, dans le but d'apprécier la plus-value de l'écouvillonnage à l'étape de pré-nettoyage. Les canules de chaque catégorie sont strictement identiques et stériles pour limiter les biais de l'étude.

B. Choix de la souillure

Parmi les souillures habituellement observées, nous retrouvons le sang frais et par conséquent la fibrine, ainsi que les graisses, les résidus osseux, les mucosités, et les fibres souillant les surfaces internes et externes des DM.

Selon le Professeur P. Heeg, Tübingen, le large spectre des souillures possibles ainsi que la difficulté à quantifier le nettoyage représente un problème crucial dans la validation des méthodes de nettoyage et il en a conclu que l'évaluation de l'aptitude d'un dispositif médical à être nettoyé n'est actuellement possible que par la combinaison de plusieurs méthodes d'examen et de souillures-tests correspondant à l'utilisation prévue (21). Plusieurs milieux biologiques sont à étudier (os, sang, graisses) et par conséquent, plusieurs « traceurs » des souillures (calcium, bicarbonates, protéines) sont envisageables pour réaliser une détection ou un dosage de souillures résiduelles.

Nous avons fait le choix d'éviter les souillures artificielles afin de recréer les conditions réelles d'utilisation des canules d'aspiration. Les canules d'aspiration sont majoritairement souillées par du sang voire par de la graisse dans le cadre d'intervention de lipoaspiration en chirurgie plastique. Ainsi, le milieu biologique retenu pour l'étude est le sang humain en raison des modalités pratiques d'approvisionnement. Les « traceurs » de cette souillure sont les protéines car présentes en grande quantité dans le sang. D'ailleurs, le sang utilisé immédiatement après prélèvement est dénommé « sang total », ce qui signifie que les protéines cellulaires seront aussi prises en compte pour le dosage protéique.

C. Choix de la méthode de dosage protéique

Au CHUGA, la propreté des DM est contrôlée visuellement à l'œil nu ou à loupe à l'issue du nettoyage. Cependant, nous sommes régulièrement confrontés au risque d'envoyer à l'étape de stérilisation, un DM pour lequel ce contrôle serait insuffisant. La méthode sélectionnée pour cette étude doit permettre une détection protéique plus sensible que le contrôle visuel et permettre d'évaluer des dispositifs, tels que les CNE, pour lesquels le contrôle visuel, l'usage de la loupe ou d'une optique ne sont pas réalisables. Les dispositifs prêts à l'emploi de type *Ecouvillon 3M™ Clean-Trace™ Surface Protéine Plus* détectent les résidus protéiques et les sucres réducteurs par une réaction colorée selon la méthode de Biuret. Malgré une simplicité d'utilisation et une sensibilité à 50µg de protéines, ce dispositif n'est pas adapté pour les CNE puisque cette technique consiste à écouvillonner le dispositif médical.

En dehors de la méthode de Biuret, les méthodes au BCA et au Coomassie présentent généralement les meilleures performances globales (sensibilité de détection et gamme d'utilisation, compatibilité avec les substances non protéiques dans l'échantillon, praticité et coût) (41). La méthode BCA est moins facile à mettre en œuvre mais présente une reproductibilité entre analyses deux fois supérieure au Coomassie (CV 10-15% contre 30%). D'autre part, le BCA offre une gamme de détection dynamique plus large que le dosage Coomassie, avec notamment un signal bien plus linéaire (proportionnel à la concentration). Les résultats peuvent ainsi être exploités par simple régression linéaire, et ce, pour des échantillons très variables, lors d'une même analyse selon le même protocole, sur la même courbe standard, ce qui est le cas de notre étude. La gamme de linéarité annoncée par le fournisseur du kit BCA est de 20 à 2000µg/ml. Par ailleurs, la méthode au BCA présente bien moins de variabilité du signal selon les protéines que le Coomassie et ceci est essentiel pour la fiabilité de mesure des protéines hétérogènes ou particulières comme des protéines membranaires, ou des mélanges complexes (extraits cellulaires) (41).

Enfin, la méthode au BCA est plus tolérante à une gamme de détergents ioniques et non-ioniques tels que NP-40, Triton X-100 et aux agents dénaturants tels que l'urée, qui ont tendance à interférer avec d'autres méthodes de quantification de protéines colorimétriques (42). La notice technique du fournisseur du kit BCA renseigne une liste de substances compatibles pour l'analyse (Tableau 15). La solution de SDS 0,1% fait partie de cette liste.

Ainsi, l'absorbance est directement proportionnelle à la quantité de protéines présentes dans la solution et peut être estimée par comparaison avec une protéine standard telle que l'albumine bovine sérique (BSA) ou à un échantillon étalon (43)(42)(44). Attention cependant, l'absorbance du colorant non complexé n'étant pas nulle ($A_{595} \sim 0,13$) il faut retrancher cette absorbance résiduelle aux valeurs obtenues avant de tracer la droite étalon.

Tableau 15 : Liste des substances compatibles avec le kit BCA fourni

Substance	Concentration	Substance	Concentration
ACES, pH 7.8	25 mM	Glycerol (pure)	10%
Acetone	10%	Guanidine-HCl	4 M
Acetonitrile	10%	HEPES	100 mM
Ammonium sulfate	1.5 M	Hydrochloric acid	100 mM
Aprotinin	10 mg/l	Imidazole, pH 7.0	50 mM
Bicine, pH 8.4	20 mM	Insect PopCulture® Reagent (Cat. No. 71187)	undiluted
Bis-Tris, pH 6.5	33 mM	Leupeptin	10 mg/l
Borate, pH 8.5	50 mM	2-Mercaptoethanol	0.01%
Brij®-35	5%	MES, pH 6.1	100 mM
Brij-56, Brij-58	1%	Methanol	10%
BugBuster® Protein Extraction Reagent (Cat. No. 70584)	undiluted	MOPS, pH 7.2	100 mM
Calcium chloride (in TBS, pH 8.0)	10 mM	Nickel chloride (in TBS, pH 8.0)	10 mM
Cesium bicarbonate	100 mM	Nonidet P-40 (NP-40)	5%
CHAPS	5%	Octyl β -glucoside	5%
CHAPSO	5%	Octyl β -thioglucopyranoside	5%
CHES, pH 9.0	100 mM	PIPES, pH 6.8	100 mM
Cobalt chloride (in TBS, pH 8.0)	0.8 mM	PMSF	1 mM
CytoBuster™ Protein Extraction Reagent (Cat. No. 71009)	undiluted	PopCulture Reagent (Cat. No. 71092)	undiluted
Deoxycholic acid	5%	Potassium thiocyanate	3.0 M
DMF	10%	Reportasol™ Extraction Buffer (Cat. No. 70909)	undiluted
DMSO	10%	SDS	5%
Dithioerythritol (DTE)	1 mM	Sodium acetate, pH 4.8	200 mM
Dithiothreitol (DTT)	0.5 mM	Sodium azide	0.2%
EDTA	10 mM	Sodium bicarbonate	100 mM
EPPS, pH 8.0	100 mM	Sodium chloride	1 M
Ethanol	10%	Sodium citrate, pH 4.8 or pH 6.4	200 mM
Ferric chloride (in TBS, pH 8.0)	10 mM	Sodium hydroxide	100 mM
Glucose	10 mM	Sodium phosphate	100 mM
Glycine-HCl, pH 2.8	100 mM	Sucrose	40%

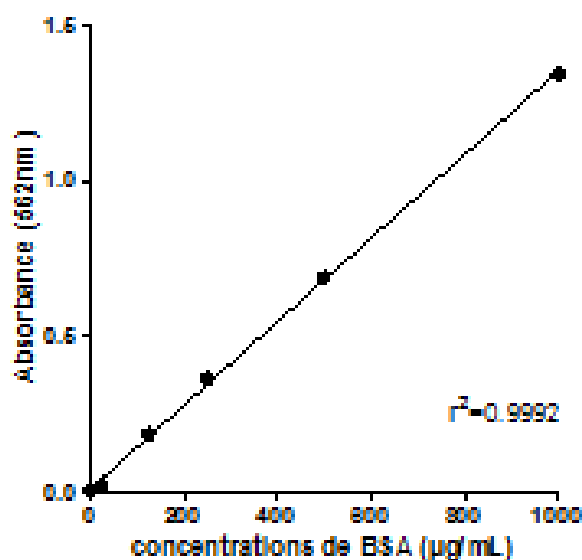
La méthode au BCA est donc celle qui nous est apparue être la plus compatible avec le modèle de souillure et le dispositif médical retenus pour notre étude.

D. Validation de la méthode de dosage des protéines résiduelles totales au BCA

1. Validation de la linéarité du kit

La linéarité du kit a été vérifiée et validée selon la notice fournisseur avec l'étalon standard BSA (bovine serum albumin) fourni (Graphique 3).

Graphique 3 : Représentation de la droite étalon avec BSA à 562nm



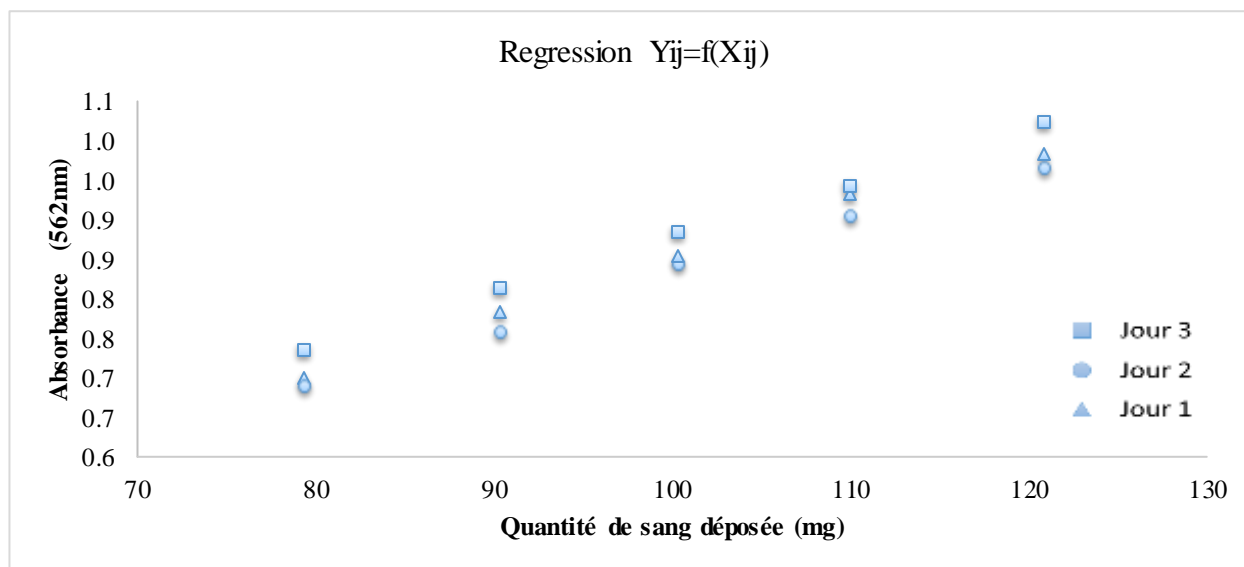
2. Validation de la méthode dans les conditions expérimentales

La démarche de validation de la méthode consistait à tester la linéarité, l'exactitude, la fidélité et la fidélité intermédiaire dans les conditions expérimentales.

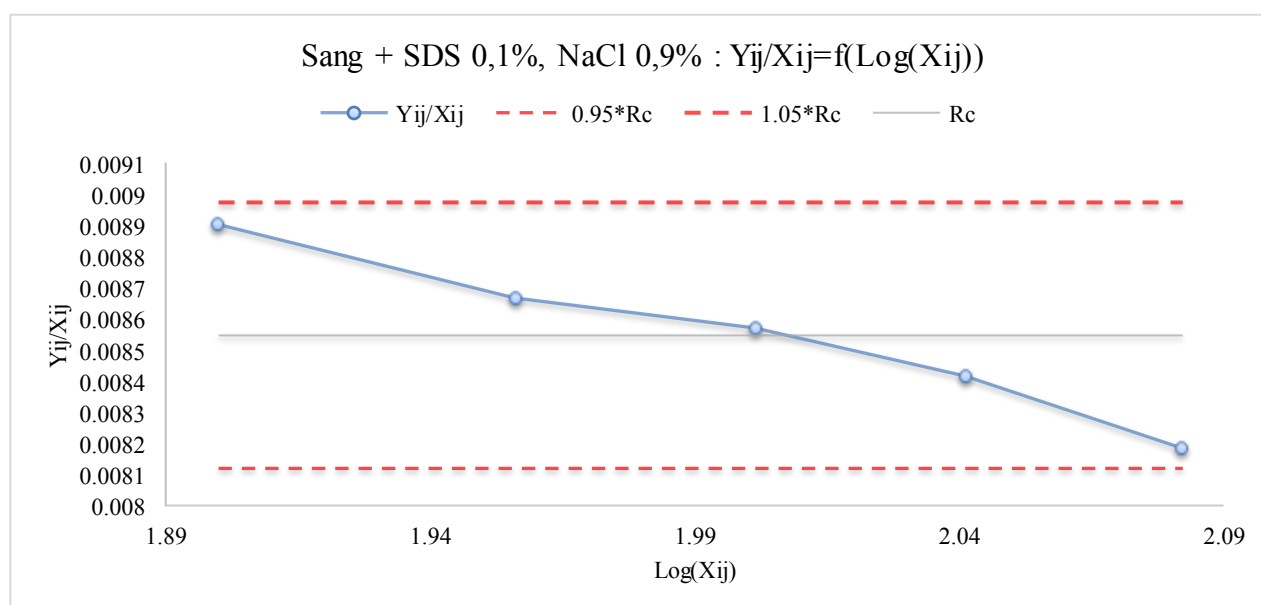
- **Evaluation de linéarité**

Après vérification de l'homogénéité des résultats, l'analyse ANOVA permet de conclure à une régression linéaire significative au seuil $\alpha=0,05$ ($p = 0.000$) (Graphique 4). Nous ne détectons pas de manque d'ajustement linéaire au seuil $\alpha=0,01$ ($p = 0,910$) (Graphique 5).

Graphique 4 : Représentation graphique de la régression linéaire des résultats des 3 jours de validation de la méthode au BCA



Graphique 5 : Représentation graphique de l'intervalle de confiance (95%) de linéarité de la méthode au BCA



- **Evaluation de l'exactitude**

L'évaluation de l'exactitude est réalisée sur les résultats collectés pour l'étude de linéarité. Le recouvrement moyen est de 99.9901% et l'IC 95% [99.4833 ; 100.4969]. L'intervalle de confiance à 95% comprend 100%, l'exactitude est donc validée.

- **Evaluation de la fidélité**

Pour l'évaluation de la fidélité de la méthode nous avons calculé le coefficient de variation de répétabilité et le coefficient de variation de fidélité intermédiaire :

- CV de répétabilité = 5,33%

- CV de fidélité intermédiaire = 5,78%

Le seuil étant habituellement fixé à $CV < 10\%$, la méthode présente une bonne répétabilité et une bonne fidélité intermédiaire. La fidélité de la méthode est validée.

Sur la base de ces résultats, le protocole expérimental de la méthode de dosage protéique au BCA est validé.

- **Détermination de la concentration protéique dans l'échantillon de sang humain utilisé pour les essais par la méthode des ajouts dosés**

Le sang peut être divisé en deux entités, les éléments figurés du sang représentés par les plaquettes, les globules blancs et les globules rouges contenant l'hémoglobine, et le plasma. Le plasma est constitué de 92% d'eau et 8% de soluté lui-même composé de 89% de protéines telles que le fibrinogène, les facteurs de la coagulation, les globulines, l'albumine, les hormones et les enzymes.

D'après la méthode des ajouts dosés la quantité de protéines présente dans le sang total ayant

servi à l'étude est de **194.97g/L**. Ainsi, les protéines sanguines totales correspondent majoritairement à ce qui est communément appelé les « protéines plasmatiques » et à l'hémoglobine.

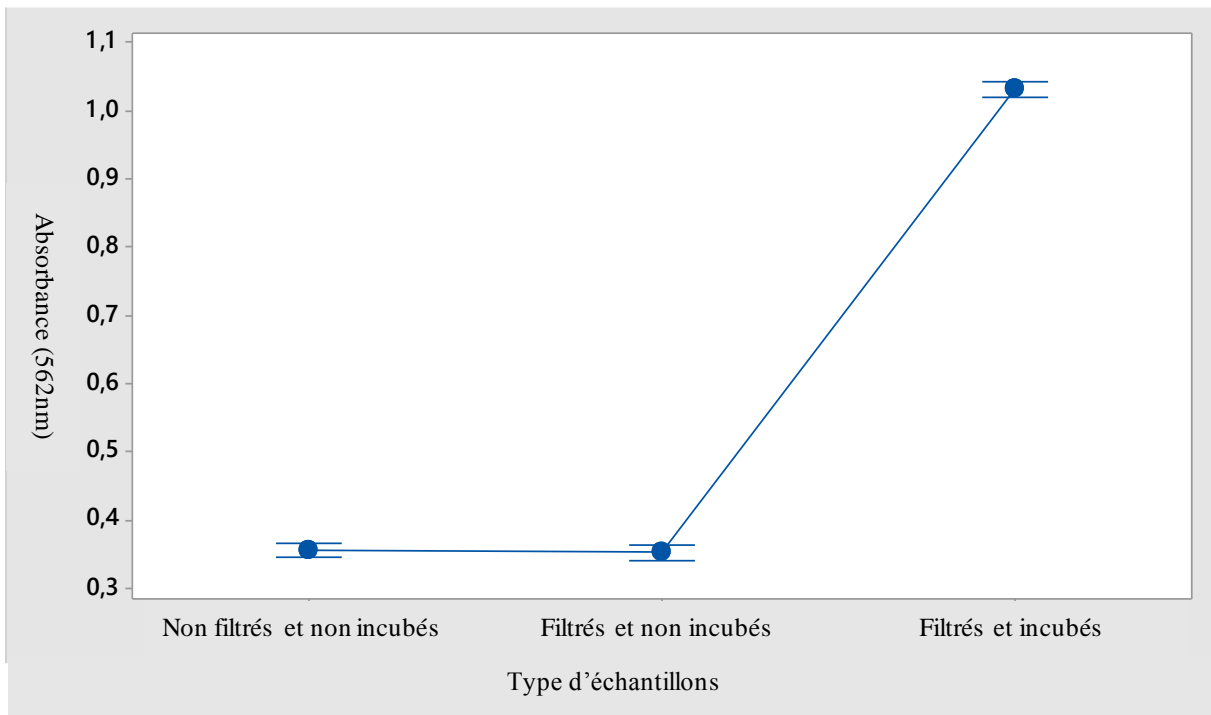
Pour la validation de la méthode au BCA, le point central de la gamme d'étalonnage correspond à 100µL de sang déposés dans 20 mL de SDS0,1%, NaCl 0,9%. Ceci revient à réaliser une dilution au 200^{ème} pour obtenir l'échantillon à doser, soit une concentration protéique d'environ 970µg/ml. Ainsi, nous pouvons en conclure que la gamme d'étalonnage réalisée pour l'étude se situe approximativement dans la gamme de linéarité annoncée par le fournisseur, c'est-à-dire entre 20 et 2000µg/ml.

- **Evaluation de l'impact de la filtration de l'échantillon sur l'absorbance à 562nm**

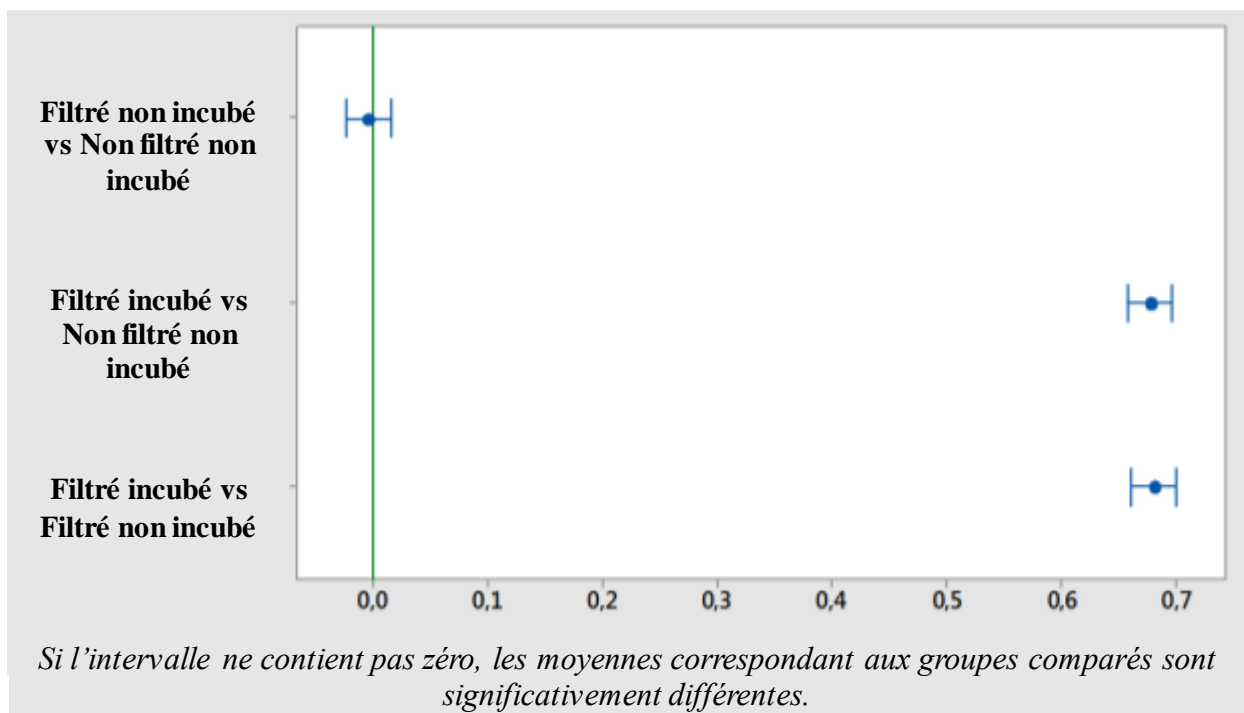
D'après l'analyse ANOVA des données représentées sur le Graphique 6, la filtration des échantillons, sans incubation avec le réactif BCA, n'impacte pas l'absorbance au seuil $\alpha=0,05$ ($p = 0,000$). Cette observation est confirmée par l'analyse de TUKEY (Graphique 7).

Ceci nous amène à nous interroger quant à l'effet de lyse du SDS 0,1% sur les cellules sanguines. Nous avons en effet utilisé un filtre 0,22µm. Sachant que le diamètre moyen des globules rouges est de 7 µm, les globules rouges auraient dû être retenus par le filtre et donc modifier l'absorbance de l'échantillon. Ce point s'explique probablement par le fait qu'un détergent tel que le SDS provoque des altérations des membranes cellulaires, ce qui en fait un agent de lyse pour les cellules sans paroi comme les cellules humaines (45).

Graphique 6 : Représentation graphique des moyennes d'absorbance et intervalles de confiance des échantillons homogènes pour l'évaluation de l'impact de la filtration à 0.22 µm



Graphique 7 : Représentation graphique des résultats du test de Tukey de comparaison des moyennes des groupes d'échantillons « filtrés et non incubés », « non filtrés et non incubés » et « filtrés et incubés »



D'autre part, les données d'absorbance des échantillons sans incubation avec le réactif BCA nous confirment que l'absorbance du sang n'est pas nulle à 562nm. Nous pouvons effectivement supposer qu'il s'agit d'un effet d'absorbance de l'hémoglobine. Ce phénomène n'est probablement pas responsable d'interférence avec la méthode de dosage, puisque l'hémoglobine fait partie des protéines dosables avec la méthode au BCA.

E. Conditions expérimentales

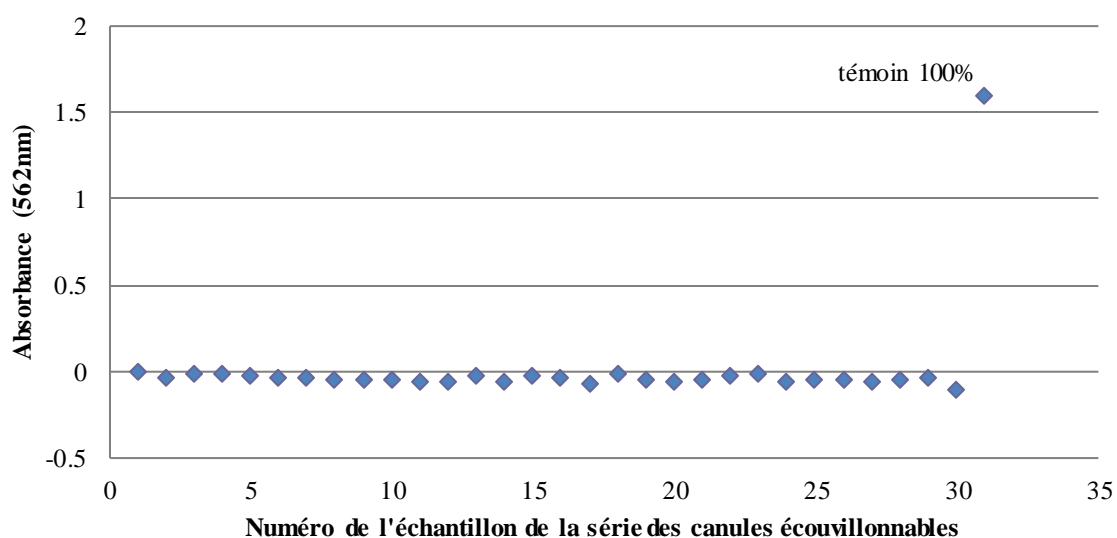
1. Etude expérimentale avec du sang prélevé sur tube hépariné

- **Canules écouvillonnables**

Le témoin 100% (aucun traitement subi après souillure du DM) indique un résultat de recouvrement à 94,9%. A partir de ce résultat, il nous est possible de définir un facteur de recouvrement à appliquer aux résultats des échantillons de la même série.

En plus d'un contrôle visuel conforme, les 30 CE présentent une absorbance nulle indiquant une quantité de protéines résiduelles totales inférieure à la limite de détection théorique du kit (<400µg/DM) après une prise en charge selon la procédure de pré-désinfection institutionnelle et un passage en LD (Graphique 8).

Graphique 8 : Absorbance à 562nm de chaque échantillon de CE après passage en LD

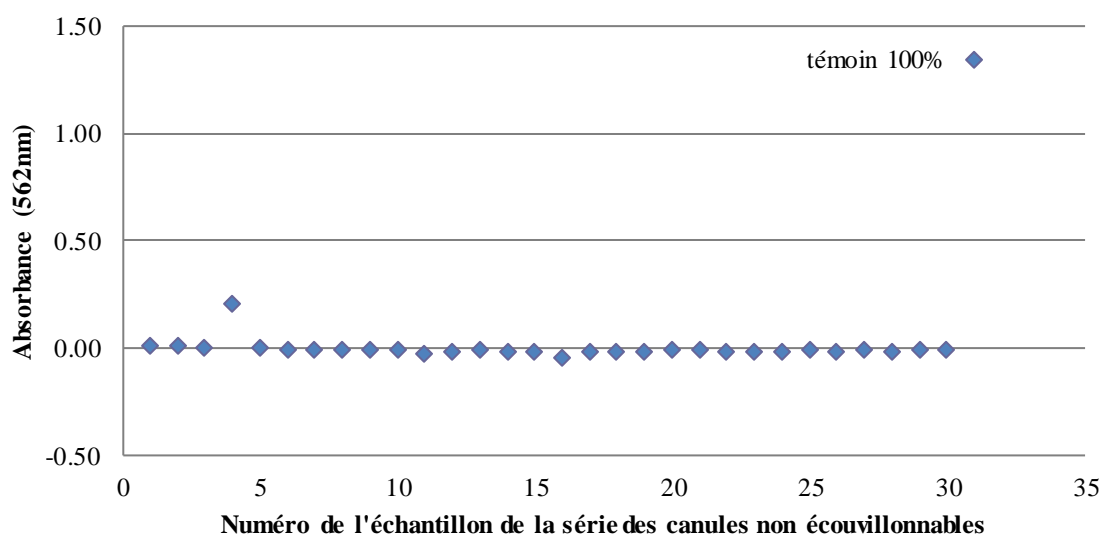


- **Canules non écouvillonnables**

Le témoin 100% (aucun traitement subi après souillure) indique un résultat de recouvrement à 98,4%. A partir de ce résultat, il nous est possible de définir un facteur de recouvrement à appliquer aux résultats des échantillons de la même série.

En plus d'un contrôle visuel conforme, 29 CNE présentent une absorbance nulle indiquant une quantité de protéines résiduelles totales inférieure à la limite de détection théorique du kit (<400µg/DM) après une prise en charge selon la procédure de pré-désinfection institutionnelle et un passage en LD (Graphique 9). Seule une canule présente une absorbance non nulle ($A_{562}=0,206$) indiquant la présence de protéines résiduelles (>400µg/DM). Nous ne sommes pas en mesure d'expliquer ce résultat.

Graphique 9 : Absorbance à 562nm de chaque échantillon de CNE après passage en LD



D'après ces deux séries d'échantillons, un passage unique en LD, et sans complément de nettoyage (écouvillonnage maintenu pour les CE), semble plus efficace sur les deux types de canules que ce qui aurait pu être attendu. Ces résultats surprenants supposent qu'un complément de nettoyage par bac à ultrasons ou avec le nettoyeur à vapeur n'est pas nécessaire. Ce constat nous a amené à nous interroger sur les caractéristiques du sang humain prélevé sur tube hépariné et sur la pertinence de ce choix. La suite de l'étude a donc été réalisée avec du sang prélevé sur tube sec.

2. Etude expérimentale avec du sang prélevé sur tube sec

Le sang total est constitué à 55% de plasma (dont 92% d'eau et 8% de soluté majoritairement représenté par les protéines) et à 45% d'« éléments figurés du sang » qui sont les globules rouges, les globules blancs et les plaquettes. Le sang total n'est pas un produit stable. Hors des vaisseaux sanguins (par exemple dans un tube de laboratoire), il coagule spontanément en quelques minutes. En effet, l'hémostase comprend plusieurs étapes dont la coagulation plasmatique ayant pour rôle de consolider le thrombus plaquettaire par la constitution d'un

réseau protéique de fibrine en une durée de 5 à 10 minutes. Le délai de formation du caillot de fibrine est donc très court (46).

Les tubes secs dédiés au prélèvement sanguin (bouchons rouges selon la norme internationale ISO 6710) permettent la coagulation irréversible et la consommation irréversible de tous les facteurs de la coagulation par la formation du caillot, contrairement aux tubes héparinés. Pour respecter strictement les conditions réelles de souillures des canules, il nous faut utiliser du sang ayant la capacité de coaguler pour ainsi observer une éventuelle adhérence du sang au support du dispositif médical, voire une obturation du canal interne de la canule.

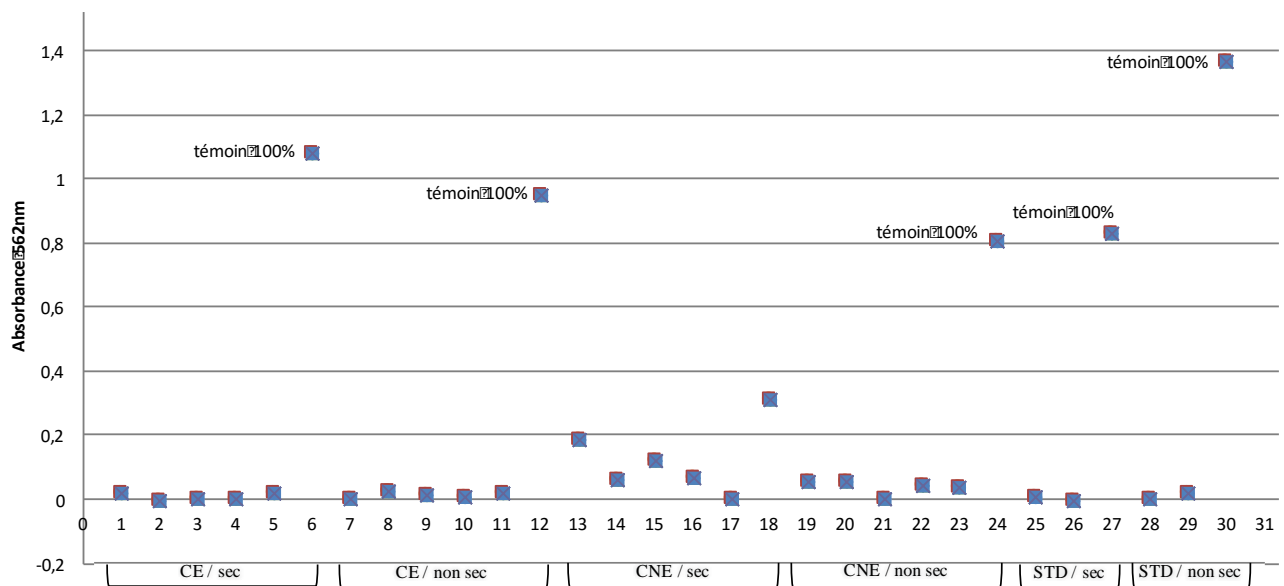
Le deuxième objectif de l'étude consiste à réaliser des tests en situation défavorable ou « worst-case » pour évaluer les écarts de procédure rencontrés en pratique, en laissant sécher la souillure de sang durant 12 heures.

- **Essais avec passage en LD sans l'étape de pré-nettoyage avec le nettoyeur à vapeur ou le bac à ultrasons**

Ayant utilisé du sang coagulé, les témoins 100% de chaque série présentent des dépôts insolubles dans les tubes à essai après l'étape d'éluion des protéines, rendant l'homogénéisation impossible et donc la mesure d'absorbance non fiable. Nous ne pouvons donc pas conclure quant au taux de recouvrement de l'étape d'éluion.

Les CE et les DM standards ne présentaient pas de résidus protéiques au contrôle visuel en sortie de LD. En revanche, les résultats portant sur les CNE ne sont pas exploitables puisqu'au contrôle visuel, le caillot de fibrine est visible à l'extrémité proximale de la canule. Celui-ci n'a pu être dissout pour procéder au dosage protéique. D'ailleurs, de par la présence de résidus visibles à l'œil nu, le résultat est fatalement non conforme.

Graphique 10: Représentation graphique des résultats d'absorbance des CE, CNE et DM standards (STD) avec sang séché (sec) ou non séché (non sec) après passage en LD sans pré-nettoyage



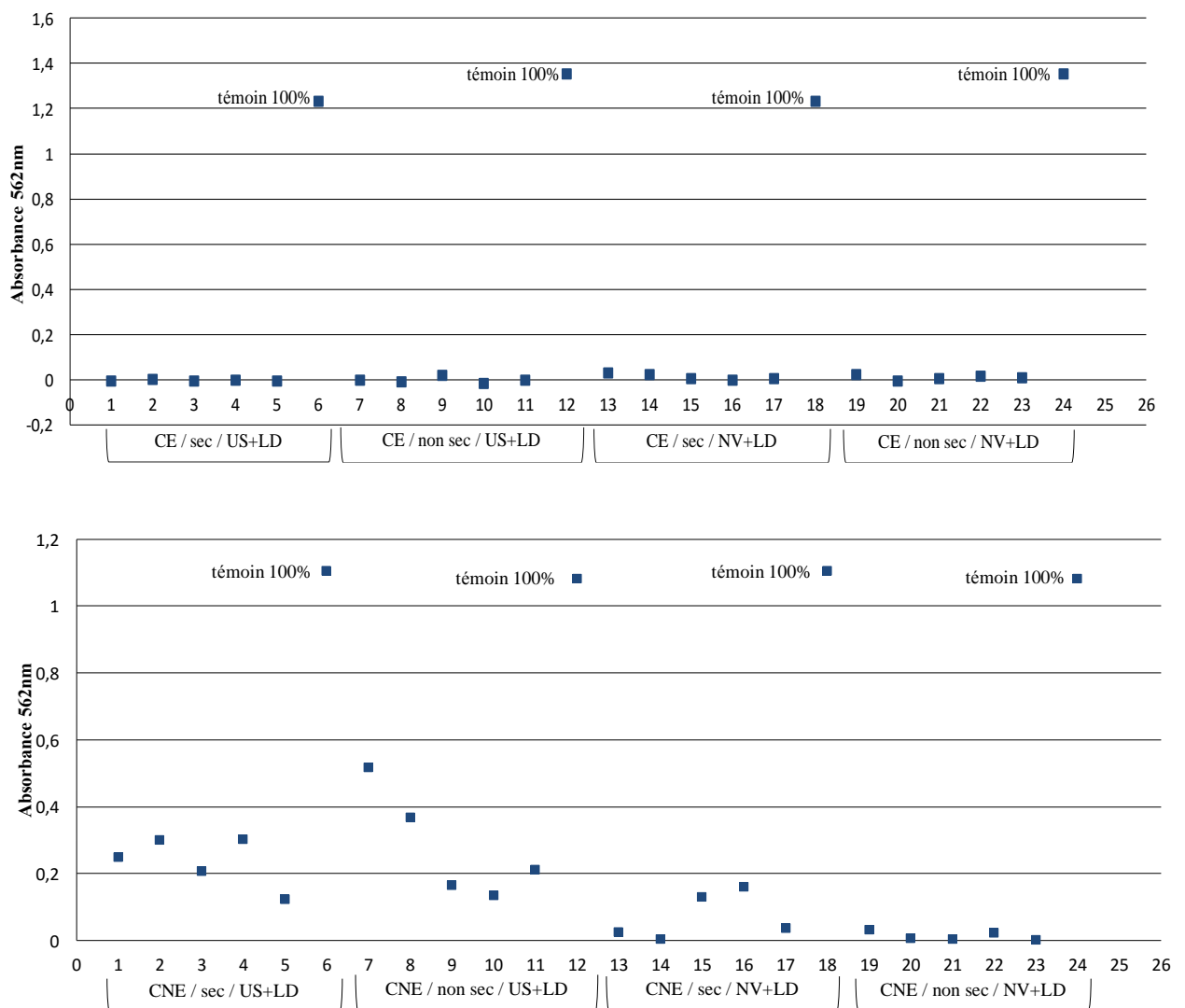
D'après l'analyse ANOVA des données illustrées par le Graphique 10, l'étape de dessiccation du sang aurait un impact sur les résultats d'absorbance des échantillons au seuil $\alpha=0,05$ ($p = 0,655$). D'autre part, la nature du DM (canule écouvillonnable vs non écouvillonnable) a également un impact sur les résultats d'absorbance au seuil $\alpha=0,05$ ($p = 0,002$). En effet, comme pour les DM standards, les CE présentent une absorbance nulle, indiquant une quantité de protéines résiduelles totales inférieure à la limite de détection théorique du kit ($<400\mu\text{g}/\text{DM}$), après une prise en charge selon la procédure de pré-désinfection institutionnelle et un passage en LD sans pré-nettoyage dans un bac à ultrasons ou avec le nettoyeur à vapeur. En revanche, le simple passage en LD n'est pas suffisamment efficace pour remettre à disposition des CNE sans souillures résiduelles, avec ou sans dessiccation.

- **Essais avec passage en LD incluant l'étape de pré-nettoyage avec le nettoyeur à vapeur ou le bac à ultrasons**

Ayant utilisé du sang coagulé, les témoins 100% de chaque série présentent des dépôts insolubles dans les tubes à essai après l'étape d'éluion des protéines, rendant l'homogénéisation impossible et donc l'absorbance non fiable. Nous ne pouvons donc pas conclure quant au taux de recouvrement de l'étape d'éluion.

A la sortie des LD, seules les CNE (sang séché ou non) pré-nettoyées dans le bac à US sont non conformes au contrôle visuel. Les résidus n'ont pu être dissous pour procéder à un dosage protéique exploitable.

Graphique 11 : Représentation graphique des résultats d'absorbance des CE et CNE avec sang séché (sec) ou non séché (non sec) après pré-nettoyage dans le bac à ultrasons (US) ou avec le nettoyeur à vapeur (NV) puis passage en LD

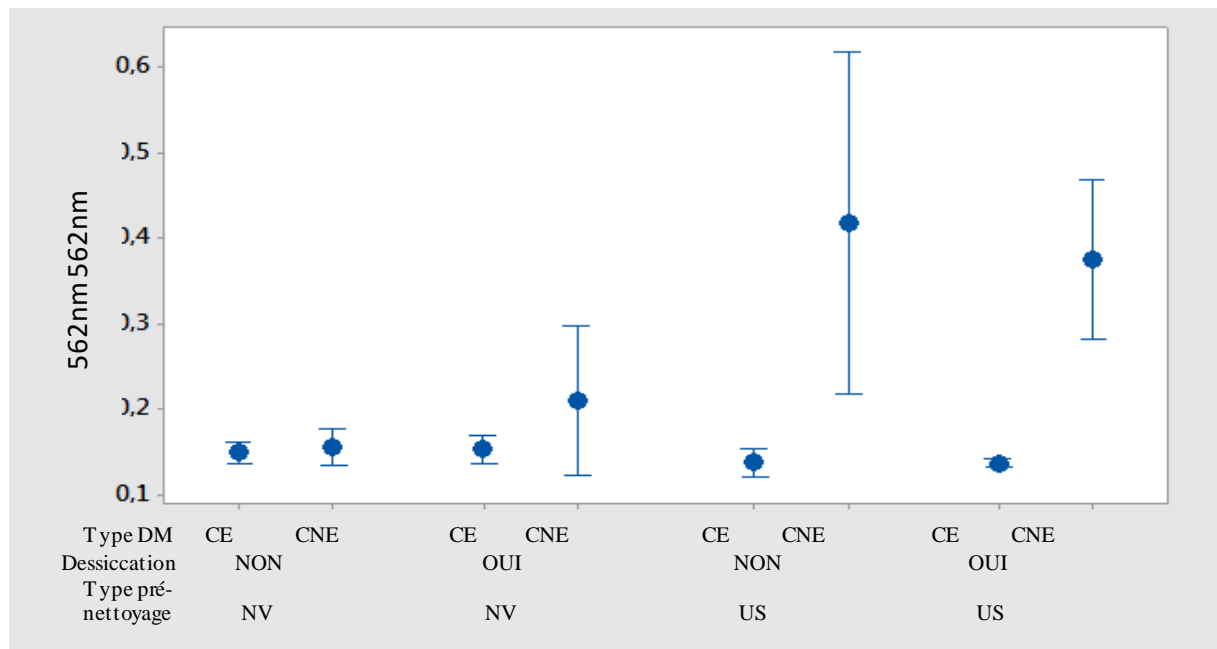


En plus d'un contrôle visuel conforme, toutes les CE présentent une absorbance nulle indiquant une quantité de protéines résiduelles totales inférieure à la limite de détection théorique du kit ($<400\mu\text{g}/\text{DM}$) après une prise en charge selon la procédure de pré-désinfection institutionnelle et un pré-nettoyage avec le NV ou le bac à US puis un passage en LD (Graphique 11). Ce résultat est principalement lié à l'étape de pré-désinfection (trempage du dispositif + écouvillonnage) qui est visuellement très efficace. Ainsi, nous ne constatons pas de différence en terme d'efficacité entre l'utilisation du bac à US et le NV pour les CE avec ou sans étape de dessiccation du sang.

Même si les résultats d'absorbance des CNE pré-nettoyées dans le bac à US ne sont pas exploitables, nous pouvons tout de même identifier une tendance. En effet, avec un pré-nettoyage dans le bac à US, les CNE sont visuellement non conformes en sortie de LD, avec ou sans étape de dessiccation du sang. Alors qu'avec le NV, les CNE avec étape de dessiccation présentent 2/5 échantillons avec une absorbance nulle et 5/5 échantillons avec une absorbance nulle pour les CNE sans étape de dessiccation. Cette analyse est également confortée par le graphique 12 ci-dessous.

D'après le test de MANN WHITNEY (échantillons non appariés), la différence entre les deux modes de pré-nettoyage est significative pour les CNE avec une étape de dessiccation ($p = 0,032$) et sans étape de dessiccation ($p = 0,016$) au seuil $\alpha=0,05$.

Graphique 12 : Représentation graphique des moyennes et intervalles de confiance 95% (IC95%) des résultats d'absorbance des CE et CNE avec sang séché (sec) ou non séché (non sec) après pré-nettoyage dans le bac à ultrasons (US) ou avec le nettoyeur à vapeur (NV) puis passage en LD



Nous observons bien une différence entre les résultats d'absorbance des deux types de canules. Les résultats pour les CE sont plus probants que ceux observés pour les CNE. Concernant l'efficacité des deux modes de pré-nettoyage, le NV semble plus efficace que le bac à US avec ou sans étape de dessiccation des souillures. La méthode de traitement la plus satisfaisant pour les CNE est leur prise en charge sans étape de dessiccation et avec l'utilisation complémentaire du NV et du LD. Ces constatations ne peuvent être fermement affirmées puisque les IC95% des différents groupes se superposent de par la large dispersion des données. Néanmoins, cette importante dispersion est le reflet d'une hétérogénéité des modes de pré-nettoyage.

F. Discussion globale de l'étude

L'objectif de notre étude est de comparer l'efficacité du pré-nettoyage avec le nettoyeur à vapeur par rapport au bac à ultrasons pour la validation du processus de nettoyage des dispositifs médicaux à corps creux.

Certains DM à corps creux rencontrés en pratique, telles que les canules, ne sont pas écouvillonnables. Ces canules sont majoritairement souillées par du sang humain et la propreté de ce type de dispositif est contrôlée visuellement (contrôle de la présence ou non de souillures) ou au moyen de colorants réagissant aux protéines. Ces deux types de contrôles dépendent toutefois largement du jugement subjectif de la personne chargée des tests. Il est en outre impossible de déterminer quantitativement les souillures résiduelles. D'autre part, le contrôle visuel ou les dispositifs prêts à l'emploi avec écouvillon réagissant aux protéines ne sont pas adaptés aux DM dont le diamètre des lumières est inférieur à 1mm. La possibilité de détecter les protéines pour valider le nettoyage des DM est néanmoins intéressante puisqu'elles sont présentes dans le sang, notamment la fibrine dont la capacité d'adhérence aux surfaces est à craindre. La recherche de résidus protéiques se justifie d'autant plus que l'on sait que le prion est une protéine naturelle (appelée PrP^c pour cellulaire) qui acquiert une conformation structurale anormale lui conférant la propriété de s'accumuler dans le système nerveux central (SNC) et de créer des lésions irréversibles conduisant à la démence et à la mort.

La méthode retenue pour l'étude est la méthode au BCA. Cette méthode est plus sensible que le contrôle visuel puisqu'elle détecte des protéines résiduelles dans le canal interne des canules qu'il est impossible de détecter à l'œil nu. Néanmoins, force est de constater qu'une limite de détection à 400µg/DM est supérieure aux diverses normes ISO ou recommandations émises par l'Allemagne ou la Suisse. Ce paramètre nous empêche d'avancer des conclusions fermes et tranchées puisque nous ne pouvons juger si une absorbance nulle révèle réellement

l'absence totale de protéines résiduelles. Ceci étant, cette étude nous permet de mettre en avant des faisceaux de preuves, qu'il faudra confirmer par une méthode de détection plus sensible. En effet, il est possible de pallier aux limites de détection de la méthode de dosage protéique au BCA (400µg/DM) en ayant recours au kit microBCA commercialisé par Thermo Fischer Scientific. Ce dernier est une version spécialisée du dosage protéique BCA permettant de déterminer la concentration en protéines d'échantillons dilués. Il en résulte un dosage permettant la mesure précise des solutions de protéines de 0,5 à 20 µg/ml. Ainsi, la quantité protéique minimale et maximale potentiellement dosable, en appliquant la même méthodologie que précédemment, serait comprise entre 10µg/DM et 400µg/DM.

La « non homogénéité » des échantillons qui présentaient des débris de caillot de fibrine au fond du tube à essai rend le dosage non fiable et surtout ininterprétable d'un point de vue quantitatif (cf annexe 3). En revanche, l'utilisation de sang hépariné fausse indéniablement les résultats de l'étape de nettoyage. Les réactions d'adhérence et de coagulation sont très clairement les étapes à stopper au plus vite au cours d'une intervention chirurgicale. A ce propos, il a été constaté dans quelques dossiers techniques industriels que la souillure test utilisée correspond notamment à du sang de bœuf citraté. Au même titre que l'héparine, le citrate empêche la coagulation du sang qui pourrait compromettre les tests d'efficacité du nettoyage réalisés sur certains dispositifs médicaux ou les tests d'efficacité de certains détergents.

Comme le proposait le Guide de validation du nettoyage et de la désinfection chimique manuels des dispositifs médicaux rédigé par la DGKH, la DGSV et l'AKI (23), le dosage protéique par méthode au BCA, n'a d'intérêt que si le dispositif médical est visuellement propre et donc sans résidus visibles au fond du tube à essai. Il est évident que si l'œil nu détecte toute trace de souillure (jusqu'à 10µg de résidus protéiques), le seuil d'acceptabilité est *a fortiori* dépassé (47). Ainsi, une méthode de dosage protéique trouve son intérêt en 2^{ème} ligne, lorsque la conception du dispositif médical ne permet pas un contrôle visuel (DM à corps creux par exemple).

La validation et/ou la vérification des opérations de nettoyage des DMR critiques sont des notions difficiles à appréhender pour les professionnels de santé tant sur l'échantillonnage que sur l'interprétation des résultats. Le choix des critères à appliquer dépendra avant tout de la méthode utilisée, mais également de la sensibilité de la méthode et du site de prélèvement. Il est difficile d'établir des valeurs limites applicables à l'ensemble des DM. La lourdeur de la méthode BCA ne permet pas son utilisation en routine mais celle-ci peut être intéressante dans d'autres indications. Elle présente un intérêt pour des campagnes d'évaluation des pratiques sous forme d'audits ou de cartes de contrôle ou encore pour des tests dédiés à des dispositifs médicaux pour lesquels le niveau d'assurance propreté est douteux, notamment au moment de sa conception (48).

Sur le marché français, des outils de contrôle de propreté des DM prêts à l'emploi se développent, témoignant de l'intérêt qu'on leur prête. Parmi eux, le test de résidus protéiques *3M™ Clean-Trace™* est un test de détection des résidus de protéines simple d'utilisation. En 15 minutes, il indique si le dispositif médical a été nettoyé selon les exigences de la norme ISO 15883 ($<3\mu\text{g}/\text{DM}$) (2). Il permet la détection de très faibles quantités de protéines. La forme et la flexibilité des écouvillons permettent de tester des surfaces difficiles à atteindre durant le lavage comme les angles, renforcements ou charnières par exemple. Un résultat « vert » signifie que le dispositif médical est suffisamment propre pour être stérilisé. Un résultat « violet » indique que le dispositif médical doit être à nouveau nettoyé. Il pourrait permettre le contrôle direct de l'efficacité du nettoyage dans le cadre de la maîtrise des risques (49). D'autres technologies telles que l'ATP-métrie arrivent également sur le marché du DM. L'Adénosine Triphosphate (ATP) est la source d'énergie contenue dans toute cellule vivante. Sa concentration est mesurée grâce à une réaction de bioluminescence où l'ATP et un complexe de Luciférine-Luciférase réagissent en générant de la lumière, mesurée par un luminomètre. Les résultats RLU obtenus sont convertis en pg ATP/ml ou en Équivalent Microorganismes/ml (50).

Néanmoins, cette nouvelle technique de contrôle de nettoyage, qui pour le moment manque de preuves scientifiques, nécessite d'être approfondie.

En tout état de cause, les moyens humains et budgétaires alloués aux services de stérilisation ne permettent pas l'utilisation en routine de ces tests à l'heure actuelle. De plus, aucun des outils prêts-à-l'emploi ne permet de répondre à la problématique des CNE.

En pratique dans les établissements de santé, le nettoyage des dispositifs médicaux doit se faire selon les instructions des fabricants. Encore faut-il que ces recommandations soient compatibles avec les procédés mis en œuvre par les services de stérilisation ! Le nettoyeur à vapeur, encore peu connu dans ce domaine d'application, n'apparaît pas dans ces instructions, bien que son utilité ait été avancée par diverses études (30)(25). Pourtant, d'après l'étude menée dans ce travail, son efficacité semble supérieure à celle du bac à ultrasons. Néanmoins, le manque d'information quant à la qualification des performances de cet équipement et le fait que son utilisation soit opérateur dépendante, sont des limites à ne pas négliger. Son utilisation mériterait donc d'être mieux maîtrisée, tant en terme de reproductibilité qu'en termes de risques de projections pour le personnel. Une enceinte de protection, sur le même modèle que les isolateurs ou « boîte à gants » pourrait être une option intéressante. L'autre problématique est de savoir si cet équipement permet d'atteindre le niveau d'assurance propreté attendu (48) et notamment d'avoir la certitude que la vapeur atteint bien l'extrémité distale des lumières.

Par ailleurs, cette étude permet de re-considérer la place des dispositifs médicaux pour lesquels un contrôle visuel n'est pas possible et pour lesquels les outils de détection protéique prêts à l'emploi ne sont pas adaptés. Notre étude met en évidence qu'avec les équipements dont nous disposons actuellement, il est impossible de garantir la propreté requise pour les CNE. Il semble nécessaire de remplacer les dispositifs médicaux qui ne peuvent être pris en charge de façon sécuritaire par de l'usage unique, et ce, même si cela représente un surcoût. Pour les autres

DM ne présentant pas de complexité extrême de par leur design, nous avons objectivé que le respect strict de la procédure institutionnelle (ne pas laisser sécher les souillures en fin d'intervention en irrigant, réaliser la prédésinfection et l'écouvillonnage) est un pré requis incontournable et efficace dans la prise en charge des dispositifs médicaux.

THESE SOUTENUE PAR : Aurélie BROS

TITRE : LE NETTOYEUR A VAPEUR A-T-IL UNE PLACE DANS LA PRISE EN CHARGE DES DISPOSITIFS MEDICAUX REUTILISABLES A CORPS CREUX EN STERILISATION ?

CONCLUSION

Au Centre Hospitalier Universitaire de Grenoble Alpes, la propreté des dispositifs médicaux réutilisables est contrôlée visuellement à l'œil nu ou à la loupe. Cependant, il existe des dispositifs médicaux complexes pour lesquels ce contrôle s'avère insuffisant voire irréalisable, en particulier pour les dispositifs médicaux à corps creux. A défaut de pouvoir visualiser les souillures résiduelles, nous avons souhaité objectiver l'efficacité de notre processus de nettoyage.

L'objectif de notre étude était d'évaluer l'efficacité du pré-nettoyage avec le nettoyeur à vapeur versus le bac à ultrasons afin de valider le processus de nettoyage des dispositifs médicaux à corps creux.

Grâce à la méthode de dosage protéique à l'acide bicinchoninique (méthode au BCA), nous avons réuni un faisceau de preuves d'une meilleure efficacité du nettoyeur à vapeur par rapport au bac à ultrasons pour le pré-nettoyage des dispositifs médicaux à corps creux souillés par du sang. Cependant, une collaboration avec les fournisseurs du nettoyeur à vapeur est requise pour rendre son utilisation plus reproductible et plus sûre pour les utilisateurs. D'autre part, la méthode au BCA que nous avons utilisée a montré ses limites, et un prochain travail pourrait exploiter la méthodologie d'essai ici décrite en utilisant le kit microBCA dont la sensibilité est plus importante.

Notre travail a également permis d'objectiver que les dispositifs médicaux non écouvillonnables doivent être remplacés par de l'usage unique puisqu'il est impossible d'en

garantir un niveau d'assurance propriété satisfaisant et sécuritaire pour le patient. Ainsi, la conception d'un dispositif médical impacte directement son aptitude à être correctement nettoyé. Si le fabricant est tenu de fournir les modalités de nettoyage de son dispositif médical, celles-ci doivent être en accord avec la réglementation et les normes applicables en France. Une collaboration, entre les utilisateurs et les fournisseurs, devrait aider dans cette démarche pour autant que les utilisateurs signalent les difficultés rencontrées et leurs contraintes. Une vidéo de sensibilisation destinée aux industriels concepteurs de dispositifs médicaux réalisée au sein des services de stérilisation du CHU de Grenoble Alpes et des Hospices Civils de Lyon illustre ces propos.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Grenoble, le : 09/09/18



LE DOYEN

Pr Michel SEVE

LE PRESIDENT DE LA THESE

Pr Denis WOUESSIDJEW



Pour la vérification et la sélection des Le Doyen de médecine Pr. Michel SEVE

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Décret n° 2004-802 du 29 juillet 2004 relatif aux parties IV et V (dispositions réglementaires) du code de la santé publique et modifiant certaines dispositions de ce code. 2004-802 juillet, 2004.
2. ISO 15883-1:2006(fr), Laveurs désinfecteurs — Partie 1: Exigences générales, termes et définitions et essais [Internet]. [cité 10 sept 2016]. Disponible sur: <https://www.iso.org/obp/ui/fr/#iso:std:iso:15883:-1:ed-1:v1:fr>
3. Endotoxines en milieu de travail. I. Origine et propriétés toxiques des endotoxines. Métrologie - Article de revue - INRS [Internet]. [cité 19 juill 2016]. Disponible sur: <http://www.inrs.fr/media.html?refINRS=TC%20136>
4. Prusiner SB, Hsiao KK. Human prion diseases. *Ann Neurol.* avr 1994;35(4):385-95.
5. Guide pour la maîtrise des traitements appliqués aux dispositifs médicaux réutilisables - FD S98-135 - Stérilisation des dispositifs médicaux [Internet]. [cité 31 juill 2016]. Disponible sur: <https://www.boutique.afnor.org/norme/fd-s98-135/sterilisation-des-dispositifs-medicaux-guide-pour-la-maitrise-des-traitements-appliques-aux-dispositifs-medicaux-reutilisables/article/776199/fa136818>
6. Infections nosocomiales [Internet]. [cité 26 août 2016]. Disponible sur: <http://www.inserm.fr/thematiques/immunologie-inflammation-infectiologie-et-microbiologie/dossiers-d-information/infections-nosocomiales>
7. 100 recommandations pour la surveillance et la prévention des infections nosocomiales 2013 [Internet]. [cité 20 août 2016]. Disponible sur: http://social-sante.gouv.fr/IMG/pdf/100_recommandations.pdf
8. Tosh PK, Disbot M, Duffy JM, Boom ML, Heseltine G, Srinivasan A, et al. Outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* surgical site infections after arthroscopic procedures: Texas, 2009. *Infect Control Hosp Epidemiol.* déc 2011;32(12):1179-86.
9. Dirty Surgical Instruments a Growing Problem in OR, Feb 2016 [Internet]. [cité 6 août 2016]. Disponible sur: http://friimedical.com/main/wp-content/uploads/2016/04/Frii_Booklet.pdf
10. Azizi J, Anderson SG, Murphy S, Pryce S. Uphill grime: process improvement in surgical instrument cleaning. *AORN J.* août 2012;96(2):152-62.
11. Guide de Bonnes Pratiques de Désinfection des dispositifs médicaux, Conseil supérieur d'hygiène publique de France, secteur prophylaxie des maladies transmissibles, Comité Technique National des Infections Nosocomiales, 1998 [Internet]. [cité 6 août 2016]. Disponible sur: http://nosobase.chu-lyon.fr/recommandations/Ministere_Sante/1998_desinfection_ministere.pdf
12. Guide bonnes pratiques pharmacie hospitalière - 22 juin 2001 [Internet]. [cité 19 juill 2016]. Disponible sur: <http://affairesjuridiques.aphp.fr/textes/arrete-du-22-juin-2001-relatif-aux-bonnes-pratiques-de-pharmacie-hospitaliere/telecharger/600292>
13. Préparation des dispositifs médicaux stériles, un rappel des précautions à observer - EM[consulte] [Internet]. [cité 6 août 2016]. Disponible sur: <http://www.em-consulte.com/en/article/83544>
14. NF EN ISO 11607-1 - Emballages des dispositifs médicaux stérilisés au stade terminal - Partie 1 : exigences relatives aux matériaux, aux systèmes de barrière stérile et aux systèmes d'emballage

[Internet]. [cité 10 sept 2016]. Disponible sur: <https://www.boutique.afnor.org/norme/nf-en-iso-11607-1/emballages-des-dispositifs-medicaux-sterilises-au-stade-terminal-partie-1-exigences-relatives-aux-materiaux-aux-systemes-de/article/687686/fa160427>

15. NF EN ISO 11607-2 - Emballages des dispositifs médicaux stérilisés au stade terminal - Partie 2 : exigences de validation pour les procédés de formage, scellage et assemblage [Internet]. [cité 10 sept 2016]. Disponible sur: <https://www.boutique.afnor.org/norme/nf-en-iso-11607-2/emballages-des-dispositifs-medicaux-sterilises-au-stade-terminal-partie-2-exigences-de-validation-pour-les-procedes-de-forma/article/625454/fa135188>

16. NF EN 868-2 - Matériaux et systèmes d'emballage pour les dispositifs médicaux stérilisés au stade terminal - Partie 2 : enveloppe de stérilisation - Exigences et méthodes d'essai [Internet]. [cité 10 sept 2016]. Disponible sur: <https://www.boutique.afnor.org/norme/nf-en-868-2/materiaux-et-systemes-d-emballage-pour-les-dispositifs-medicaux-sterilises-au-stade-terminal-partie-2-enveloppe-de-sterilisa/article/782806/fa155870>

17. NF EN 285+A2 - Stérilisation - Stérilisateur à la vapeur d'eau - Grands stérilisateur [Internet]. [cité 10 sept 2016]. Disponible sur: <https://www.boutique.afnor.org/norme/nf-en-285a2/sterilisation-sterilisateur-a-la-vapeur-d-eau-grands-sterilisateur/article/767636/fa163849>

18. NF EN 13060+A2 - Petits stérilisateur à la vapeur d'eau [Internet]. [cité 10 sept 2016]. Disponible sur: <https://www.boutique.afnor.org/norme/nf-en-13060a2/petits-sterilisateur-a-la-vapeur-d-eau/article/751858/fa167189>

19. Avis SF2S/SF2H relatif aux dispositifs médicaux réutilisables devant être stériles | SF2H [Internet]. [cité 9 août 2016]. Disponible sur: <https://sf2h.net/publications/avis-sf2ssf2h>

20. INSTRUCTION N° DGOS/PF2/DGS/VSS1/2016/220 du 4 juillet 2016 relative à relative au traitement des endoscopes souples thermosensibles à canaux au sein des lieux de soins [Internet]. [cité 27 août 2016]. Disponible sur: http://circulaires.legifrance.gouv.fr/pdf/2016/08/cir_41172.pdf

21. Méthodes de contrôle des processus de nettoyage, de désinfection et de stérilisation, Andrea Binder, Sterilgut-, Logistik-, Instrumentenmanagement, Wels (Autriche) [Internet]. [cité 31 juill 2016]. Disponible sur: http://www.sssh.ch/uploads/media/f0203_Binder_F.pdf

22. Le lavage : Une étape cruciale en stérilisation, Jean-Alexandre PIERRAT, Vice-président de l'AFS, Hammamet – 22 & 23 avril 2015 [Internet]. [cité 31 juill 2016]. Disponible sur: http://www.docvadis.fr/pharmacie.sainte-anne/document/pharmacie.sainte-anne/communication_orale_internationale2/fr/metadata/files/0/file/FORM-COM63-Communication%20orale-Le%20lavage,%20une%20%C3%A9tape%20cruciale%20en%20st%C3%A9rilisation-%20%C3%A8mes%20JTSDT-Tunisie%20-2015.pdf

23. Leitlinie von DGKH, DGSV und AKI für die Validierung und Routineüberwachung maschineller Reinigungs- und thermischer Desinfektionsprozesse für Medizinprodukte und zu Grundsätzen der Geräteauswahl, 2008, Zentral Sterilisation [Internet]. [cité 20 août 2016]. Disponible sur: http://www.krankenhaushygiene.de/pdfdata/leitlinien/validierung_weiss.pdf

24. Anforderungen an die Hygiene bei der Aufbereitung von Medizinprodukten - Medprod_Rili_2012.pdf [Internet]. [cité 20 août 2016]. Disponible sur: https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Krankenhaushygiene/Kommission/Downloads/Medprod_Rili_2012.pdf?__blob=publicationFile


25. Procédes de pré nettoyage: nettoyeur vapeur et bac à ultrasons, Annette BEUGAS, Marie Agnès GAILLARD, CHU Limoges Reims, 9 avril 2014, 36 èmes Journées Nationales d'Etudes sur la Stérilisation [Internet]. [cité 31 juill 2016]. Disponible sur: http://www.cefh-ceps.com/actualite//ateliers_2014/atelier3%20pre%20nettoyage%20V6.pdf
26. Bacs de nettoyage à ultrasons: principe de fonctionnement, Elmasonic [Internet]. [cité 7 août 2016]. Disponible sur: http://www.comptoir-medical-rochelais.fr/030112_ultrason.pdf
27. Méthode de contrôle des performances des bacs ultrasons, Camille FAYARD, Unité de stérilisation Centralisée du CH de Chambéry 2ème JIFS - 12 & 13 septembre 2014 [Internet]. [cité 31 juill 2016]. Disponible sur: http://afs.asso.fr/cms/uploads/pdf/echanges/2JFS/07_FAYARD_Camille_JIFS_V3.pdf
28. Les ultrasons, Lambert Christophe, AFS, septembre 2014 [Internet]. [cité 31 juill 2016]. Disponible sur: <http://afs.asso.fr/cms/uploads/Documents/Bulletin%20US%20-%2026%2009%202014.pdf>
29. Les ultrasons, Frédy Cavin – Expert en stérilisation CHUV Journées SSSH du 21 mars 2015 [Internet]. [cité 31 juill 2016]. Disponible sur: http://www.sssh.ch/uploads/media/03_Ultrasons.pdf
30. Le nettoyeur vapeur : intérêt et positionnement dans un service de stérilisation, A.C. BONDON, D. ROUSSEAU, C. DENIS, CHRU de Lille, Secteur Stérilisation, 2 avenue Oscar Lambret, 59037 Lille [Internet]. [cité 2 août 2016]. Disponible sur: http://www.cefh-ceps.com/actualite/posters/35ieme_journee/Poster%20n%C2%B02014.pdf
31. La prise en charge des dispositifs médicaux difficiles à nettoyer, Frédy Cavin, Etienne Aubry, CHUV, Lausanne [Internet]. [cité 31 juill 2016]. Disponible sur: http://www.sssh.ch/uploads/media/f0404_cavin_F.pdf
32. Association for the Advancement of Medical Instrumentation: AAMI TIR30/Ed.2, A compendium of processes, materials, test methods, and acceptance criteria for cleaning reusable medical devices [Internet]. [cité 31 juill 2016]. Disponible sur: https://standards.aami.org/kws/public/projects/project/details?project_id=321
33. BC Assay [Internet]. [cité 7 août 2016]. Disponible sur: http://www.chimiegenerale.com/bc_assay.php
34. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* oct 1985;150(1):76-85.
35. Walker JM. The bicinchoninic acid (BCA) assay for protein quantitation. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 1994;32:5-8.
36. BCA Assay for Protein Determination - NFSC 450 [Internet]. [cité 8 août 2016]. Disponible sur: <http://nfsc4500101groupa.weebly.com/bca-assay-for-protein-determination.html>
37. article_Moulaire.pdf [Internet]. [cité 26 août 2016]. Disponible sur: http://www.ceppral-sante.fr/document/article_Moulaire.pdf
38. BIOCHIMIE - Constantes_biologicals_adultes_2009.pdf [Internet]. [cité 21 août 2016]. Disponible sur: http://www.cnci.univ-paris5.fr/pharmacie/Constantes_biologicals_adultes_2009.pdf
39. ICH Q2_R1__Guideline.pdf [Internet]. [cité 7 août 2016]. Disponible sur:

http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf

40. Biochimie Structurale et Fonctionnelle - Pascale Bobillo - Propriétés optiques [Internet]. [cité 21 août 2016]. Disponible sur: <https://restice.univ-montp2.fr/BsfDun/co/proprietes.html>
41. Comment bien choisir son dosage protéique, un choix pas si anodin, février 2015 [Internet]. [cité 8 août 2016]. Disponible sur: http://www.interchim.com/blog_fr/?s=bca
42. Friedenauer S, Berlet HH. Sensitivity and variability of the Bradford protein assay in the presence of detergents. *Anal Biochem.* 1 mai 1989;178(2):263-8.
43. Olson BJSC, Markwell J. Assays for determination of protein concentration. *Curr Protoc Protein Sci Editor Board John E Coligan Al.* mai 2007;Chapter 3:Unit 3.4.
44. The Bradford method for protein quantitation. - PubMed - NCBI [Internet]. [cité 8 août 2016]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7951753>
45. Brevet WO2007061274A1 - Kit universel pour la lyse cellulaire - Google Brevets [Internet]. [cité 30 août 2016]. Disponible sur: <https://www.google.com/patents/WO2007061274A1?cl=fr>
46. PHYSIOLOGIE DE L'HÉMOSTASE Janvier 2007, J. F. Schved, Faculté de Médecine Montpellier - Nîmes [Internet]. [cité 20 août 2016]. Disponible sur: http://www.med.univ-montp1.fr/enseignement/cycle_1/PCEM2/mod-base/MB7_Bio_Med/Ressources_locales/HEMATO/H3_Hemostase-v2.pdf
47. Sample QA Tray Policy - hemocheck_sample_policy_7_2016.pdf [Internet]. [cité 10 sept 2016]. Disponible sur: https://zimbra.free.fr/service/home/~/hemocheck_sample_policy_7_2016.pdf?auth=co&loc=fr&id=117480&part=2
48. Nettoyage des instruments creux: le niveau d'assurance propreté est-il garanti? Retour d'expérience à la stérilisation centrale des Hôpitaux Universitaires de Genève, Hervé Ney, JNSS, Fribourg 2010 [Internet]. [cité 10 sept 2016]. Disponible sur: http://www.sssh.ch/uploads/media/03_ney_F.pdf
49. Les 33èmes Journées Nationales d'Etudes sur la Stérilisation dans les Etablissements de Santé [Internet]. [cité 10 sept 2016]. Disponible sur: <http://www.cefh-ceps.com/actualite/jns33-label.htm>
50. QG21I™. Kit d'analyse Microbiologique rapide des bains de cataphorese, laits carbonatés, Mesure de la flore totale par atp 2G. - Kit_analyse_Microbio_Flore_totale_cataphorese.pdf [Internet]. [cité 30 août 2016]. Disponible sur: http://www.aqua-tools.com/doc_fr/pdf/Kit_analyse_Microbio_Flore_totale_cataphorese.pdf

ANNEXES

Annexe 1 - Procédure institutionnelle de pré-désinfection des dispositifs médicaux réutilisables

	Comité de Lutte contre les Infections Nosocomiales	CLIN-PRO-083
	Pré-désinfection des DM à stériliser dans les blocs chirurgicaux et les plateaux techniques	
Date de diffusion : janvier 2014	Rédigé par : J. Shum et S. Levet	
Version : 3	Vérifié par : M.R. Mallaret, N. Sylvoz, I. Jallon et C. Chardon	
Nombre de pages : 5	Approuvé par : C. Guimier Pingault pharmacien stérilisation	

I. OBJET

Décrire le pré-traitement à effectuer sur les dispositifs médicaux (DM) réutilisables avant transport vers la stérilisation centrale, afin de minimiser les risques de contamination du personnel et de l'environnement et de faciliter le nettoyage ultérieur des DM. Cette opération expose à un risque de contamination par les liquides biologiques.

II. DOMAINE

- Lieu : blocs opératoires, plateaux techniques, qui utilisent le produit détergent désinfectant pour D.M.
- Type de D.M. : tous les DM, utilisés ou non au cours de l'intervention, à l'exclusion des conteneurs.

III. RESPONSABILITES

- ASH, brancardiers du bloc opératoire assure la préparation de la solution, la vérification de l'immersion des DM, la vidange et le rinçage des DM après la durée requise, le dépôt dans les armoires de transport
- IDE/IBODE/IADE ou sage femme du bloc opératoire assure le tri par boîtes, le démontage et l'irrigation des DM, indique le risque Prion du patient et de l'intervention et signale les instruments manquants ou défectueux. Elle signale les DM nécessitant un traitement prioritaire.

IV. DEFINITIONS

Pré-désinfection : "La pré-désinfection est le premier traitement à effectuer sur les objets et matériels souillés dans le but de diminuer la population de micro-organismes et de faciliter le nettoyage ultérieur. Il est impératif d'éviter le séchage des souillures sur le matériel. La pré-désinfection a également pour but de protéger le personnel lors de la manipulation des instruments et de protéger l'environnement. Elle est réalisée le plus rapidement possible après utilisation du dispositif médical, au plus près du lieu d'utilisation, avant le nettoyage, selon une procédure approuvée par le responsable du système permettant d'assurer la qualité". (B.P.P.H.)

« Les opérations de stérilisation des dispositifs médicaux comportent, d'une part une étape de pré-désinfection et, d'autre part les étapes de préparations des dispositifs médicaux suivantes : le nettoyage, le conditionnement, la stérilisation proprement dite, les contrôles des différentes opérations, le stockage et la mise à disposition. En dehors de la pré-désinfection, ces opérations sont obligatoirement mises en œuvre par la pharmacie à usage intérieur dans les locaux affectées à cette activité... » (B.P.H.H.)

V. DESCRIPTION

5-1- Tenue :

- Tenue de base conforme selon le secteur
- Lunettes ou masque à visière en cas de risque de projections
- Tablier plastique + gants d'entretien pour l'agent qui réalise rinçage des DM et vidange du bac

5-2- Equipements :


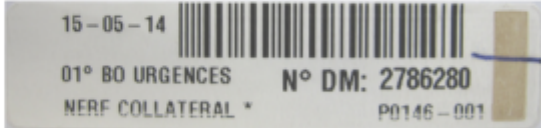
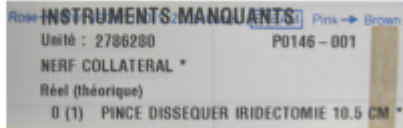
- Bacs de pré-désinfection : en matière plastique, avec couvercle, gradués
- Produit pour pré-désinfection en flacon avec pompe de dosage (1 dose 25 ml pour 5 L) ou centrale de distribution du produit dilué
- Borne de vidange

5-3- Précautions particulières :

- la durée minimum de contact des DM avec la solution de pré-désinfection est de 15 minutes ; toute prolongation de la durée du trempage augmente le risque de corrosion des DM et de dépôt d'un biofilm
- la solution de pré-désinfection est éliminée après chaque utilisation et une nouvelle solution est préparée pour chaque intervention
- pour une même intervention, les dispositifs impliquant des contacts avec des tissus de niveaux de risque Prion différents doivent être placés dans des bains différents.

Attention : en cas d'acte chirurgical sur patient SUSPECT ou ATTEINT de maladie de Creutzfeldt-Jakob, contacter la stérilisation pour demander un bac spécifique de pré désinfection et le détergent désinfectant prionicide (Cf. procédure PHARMA-STE-INS-039)

5-4- Etapes de la pré-désinfection réalisées en salle d'intervention ou d'examen

Qui ?	Comment ?
<p>Sage-femme IBODE IDE IADE IDE Circulante</p> 	<ul style="list-style-type: none"> • Les bacs de pré-désinfectant sont préparés et amenés par les brancardiers • Vérifier systématiquement l'absence d'aiguilles et de coupant-tranchants ; démonter et jeter lames et aiguilles à usage unique dans un collecteur piquants-tranchants • Débarrasser les instruments des déchets biologiques résiduels en les essuyant avec une compresse : mèches, fraises, pointes de bistouris électriques, pinces bipolaire, DeBakey... etc. • Ouvrir tous les instruments articulés et démonter toutes les parties amovibles y compris pour les instruments non utilisés • Trier les instruments boîte par boîte (listing des boîtes disponible sur le SharePoint de la Stérilisation Centrale) et les remettre dans le panier du conteneur correspondant ; prendre un 2^{ème} panier si nécessaire • Isoler dans une boîte à bijoux ou un panier grillagé spécifique : <ul style="list-style-type: none"> - DM fragiles (ex : optiques) ou de petites tailles pour éviter perte ou détérioration - DM piquants (ex : alènes de redon) pour protéger le personnel tout au long du circuit • Isoler dans un panier spécifique pour prise en charge particulière en stérilisation centrale <ul style="list-style-type: none"> - DM creux à irriguer - DM nécessitant d'être brossés par la stérilisation : bipolaire etc. • Irriguer à la seringue les canaux des instruments creux avec la solution de pré-désinfection jusqu'à observer le libre écoulement de la solution • Disposer au-dessus les petits paniers avec DM fragiles ou DM creux, les paniers avec les DM creux et DM à brosser... • Vider les cupules avant immersion • Placer chaque panier dans le bain, en veillant à l'immersion complète • Identifier tous les paniers ayant servi pour une même intervention grâce à un jeu de plaquettes marquées d'une lettre (plaquette « PRION » si acte à risque) fourni par la stérilisation centrale • Remettre le couvercle sur le bac • Essuyer les DM non immergeables (moteurs, câbles..) avec une lavette imbibée de détergent désinfectant et les placer dans un bac spécifique. • Identifier les DM défectueux devant être envoyés en réparation (avec fil ou clip) <p>Remarques :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Toute boîte non utilisée mais ouverte doit également subir une pré-désinfection - En absence d'une IDE instrumentiste, l'IDE circulante ou la sage-femme se charge de la pré-désinfection.
<p>Compléter la fiche de liaison</p> <p>IBODE IDE Sage femme IADE IDE Circulante</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Choisir la fiche de liaison : Saumon si acte à risque prion / Blanche pour tous les autres actes • Coller une étiquette « patient » (ne pas effacer son nom) dans la case prévue • Si acte à risque prion, vérifier que sont notées les informations sur risque Prion du patient et de l'acte • Remplir <ul style="list-style-type: none"> - l'heure du début de pré-désinfection = immersion du dernier DM - le ou les numéros de bacs de trempage utilisés - la lettre du jeu de plaquettes ajouté dans les paniers - les problèmes : instruments défectueux ou cassés • Coller les étiquettes T-Doc retour ou noter le nom des boîtes et DM satellites repartant en stérilisation • Coller les étiquettes T-Doc des « DM manquants » <div style="display: flex; justify-content: space-around;">   </div> <p>Si la stérilisation doit être réalisée en urgence, noter URGENT + n° de la (ou des) boîte(s) sur la feuille de liaison dans la partie information. Contactez la stérilisation (mail sté38 + appel du 67207) pour informer de la demande.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Placer la fiche sur le dessus du bac

5-5- Etapes de la pré-désinfection réalisées à l'office d'entretien du matériel

Qui ?	Comment ?
ASH, agent bloc, Brancardiers, AS, IDE	<ul style="list-style-type: none"> • Préparer les bacs <ul style="list-style-type: none"> - Bacs propres, nombre de bacs adapté à l'intervention - Produit pré-désinfectant dilué dans l'eau froide ou à l'aide du diluteur - Amener le chariot avec les bacs couverts près de la salle
ASH ou AS bloc Brancardiers	<p>DM non immergeables (moteurs, câbles...)</p> <ul style="list-style-type: none"> - Essuyer les surfaces externes avec une lavette imbibée de détergent désinfectant - Déposer le DM au-dessus du bac, dans l'armoire partant en stérilisation <p>DM immergeables</p> <ul style="list-style-type: none"> - Vérifier l'immersion totale des instruments ; si besoin compléter les bacs avec la solution pré-désinfectante pour une immersion complète - Amener le chariot près de la pompe d'aspiration - Après 15 minutes effectives de trempage, aspirer la solution avec la borne d'aspiration - Rincer soigneusement et abondamment les DM de chaque panier avec la douchette d'eau froide - Aspirer l'eau de rinçage de chaque bac - Remettre les paniers avec les DM égouttés dans le conteneur correspondant : les laisser dans les bacs seulement si le volume est trop important - Noter l'heure de la fin de pré-désinfection sur la fiche de liaison dans la case "rinçage" et le nom de l'agent - Mettre bacs, DM et conteneurs dans les armoires (zone départ bloc) - Placer la fiche de liaison à l'intérieur de l'armoire - Si la stérilisation doit être réalisée en urgence noter « Urgent » sur une feuille placée à l'extérieur de l'armoire avec le numéro de la ou des boîte(s) devant être stérilisée en urgence. - Si les bacs utilisés ne sont pas renvoyés en stérilisation : nettoyer l'intérieur et l'extérieur du bac avec une lavette imprégnée de détergent désinfectant. - Le matériel doit partir à la stérilisation au fur et à mesure de son traitement : il ne faut pas attendre la fin du programme ou le remplissage de l'armoire pour renvoyer l'armoire en stérilisation. <p>Biper la logistique au bip 704 pour une prise en charge immédiate de l'armoire.</p>

VI. DOCUMENTS ASSOCIES

- Consignes pour la prise en compte du risque Prion - **CLIN-PRO-069**
- Recommandations concernant l'utilisation du détergent-désinfectant pour la pré-désinfection des dispositifs médicaux - **CLIN-FT-038**
- Utilisation et entretien de la borne de vidange "PERISTEL" BVL 2/2 - **CLIN-FT-091**
- Fiche de liaison bloc opératoire / stérilisation - en page 4

Diffusion	Unité d'hygiène, pharmacien stérilisation, cadres des blocs et des plateaux tech., cadre département d'anesthésie, cadre sup. des blocs	Janvier 2014
Classement	Vdoc ; Rubrique « Hygiène/CLIN » ; Thèmes : « Blocs opératoires » et « Entretien des dispositifs médicaux »	
Rédaction	J. Shum et S. Levet - Hygiène Hospitalière et Gestion des Risques	Novembre 2013
Vérification	M.R. Mallaret, N. Sylvoz, I. Jallon et C. Chardon	Décembre 2013
Approbation	Séance CLIN	Janvier 2014
Historique	CLIN-PRO-083-1 - Pré-désinfection des DM à stériliser dans les blocs chirurgicaux et les plateaux techniques	Mars 2006
	CLIN-PRO-083-2 - Pré-désinfection des DM à stériliser dans les blocs chirurgicaux et les plateaux techniques	Janv. 2009



Annexes

- faire imprimer la fiche de liaison bloc opératoire -> stérilisation **acte non à risque prion**, patient standard sur **feuilles blanches**
- faire imprimer la fiche de liaison bloc opératoire -> stérilisation **acte à risque prion**, sur **feuilles saumon**

FICHE DE LIAISON BLOC OPERATOIRE => STERILISATION

(Acte non à risque Prion, patient standard)

NOM DU BLOC :	N° SALLE :	ETIQUETTE PATIENT
DATE :		

PARTIE RESERVEE AU BLOC OPERATOIRE

<p>Etiquettes de tracabilité de tous les DM restérilisables utilisés au cours de l'intervention</p>	
---	--

<p>Contrôle des implants par IBODE du bloc</p>	<p>Boite P.....</p> <p><input type="radio"/> Boite à stériliser en l'état</p> <p><input type="radio"/> Boite à mettre en attente</p>	<p>Boite P.....</p> <p><input type="radio"/> Boite à stériliser en l'état</p> <p><input type="radio"/> Boite à mettre en attente</p>
--	--	--

<p>Renseignement divers</p>	
---------------------------------	--

Si demande de traitement prioritaire, pensez à appeler le poste 67207 et faire un mail à sté38.

PREDESINFECTION	HEURE	INTERVENANTS
TREMPAGE	<input type="text"/>	<input type="text"/>
RINCAGE	<input type="text"/>	<input type="text"/>
N° DES BACS :	<input type="text"/>	Code plaquettes lavage <input type="text"/>

PARTIE RESERVEE A LA STERILISATION

<p>HEURE PRISE EN CHARGE LAVAGE :</p>	<p>NOMBRE DE PANIERS DE LAVAGE :</p>
<p>AGENT DE STE :</p>	

**ACTE A RISQUE PRION
FICHE DE LIAISON BLOC OPERATOIRE => STERILISATION**

NOM DU BLOC :

N° SALLE :

ETIQUETTE PATIENT

DATE :

Risque Prion	Patient	<input type="radio"/> Standard ou non interrogeable	<input type="radio"/> Suspect ou atteint : contacter unité d'hygiène ou sté
	Préciser l'acte à risque prion	<input type="radio"/> Neurochirurgie (à l'exclusion de la chirurgie orthopédique du rachis) <input type="radio"/> Ophtalmologie chirurgicale touchant la rétine ou le nerf optique <input type="radio"/> Chirurgie ou endoscopie touchant la muqueuse olfactive	

PARTIE RESERVEE AU BLOC OPERATOIRE

<p>Etiquettes de tracabilité de tous les DM restérilisables utilisés au cours de l'intervention</p>	
---	--

Contrôle des implants par IBODE du bloc	Boite P..... <input type="radio"/> Boite à stériliser en l'état <input type="radio"/> Boite à mettre en attente	Boite P..... <input type="radio"/> Boite à stériliser en l'état <input type="radio"/> Boite à mettre en attente
---	---	---

Renseignement divers	
----------------------	--

Si demande de traitement prioritaire, pensez à appeler le poste 67207 et faire un mail à sté38.

PREDESINFECTION	HEURE	INTERVENANTS
TREMPAGE	<input type="text"/>	<input type="text"/>
RINCAGE	<input type="text"/>	<input type="text"/>
N° DES BACS :	<input type="text"/>	Code plaquettes lavage <input type="text"/>

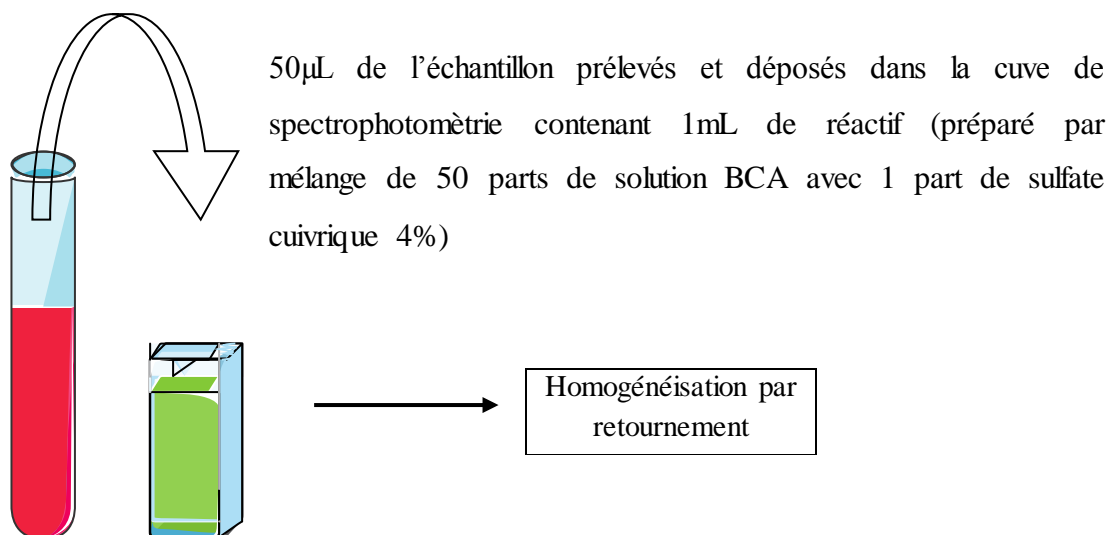
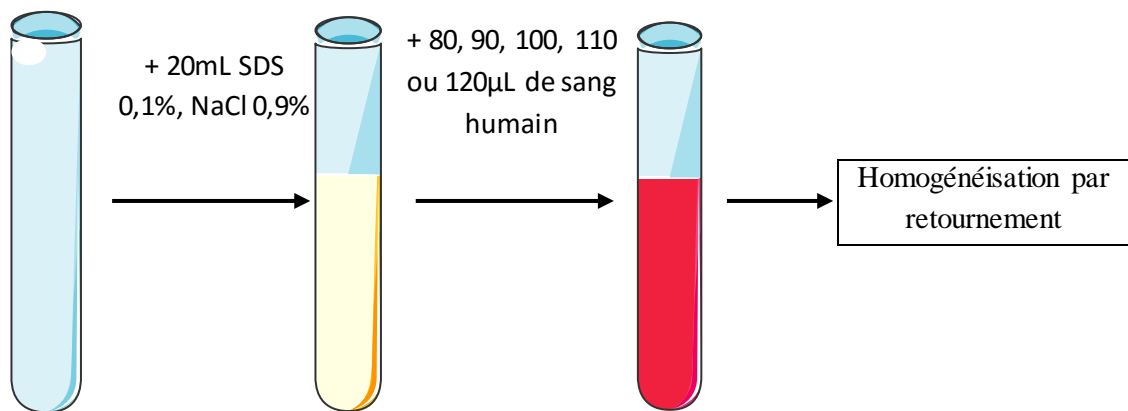
PARTIE RESERVEE A LA STERILISATION

HEURE PRISE EN CHARGE LAVAGE :	NOMBRE DE PANIERS DE LAVAGE :
AGENT DE STE :	

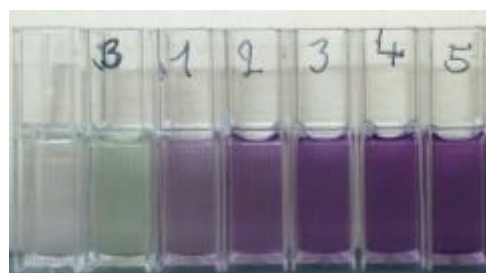
NETTOYAGE - CYCLE PRIONICIDE	<input type="radio"/> En laveur	N° Laveur	N° Cycle
	<input type="radio"/> Manuel	Réalisé par : nom opérateur	

Annexe 2 - Mode opératoire de la méthode de dosage de protéines résiduelles totales au BCA







- Préparation de la gamme d'étalon



- Préparation du blanc avec 50µL de SDS 0,1%, NaCl 0,9% et 5 cuves avec 50µL provenant des 5 échantillons à proportions croissantes de sang humain ajouté : 80 µL (1), 90µL (2), 100µL (3), 110µL (4), 120µL (5),
- Mis en incubation au bain marie à 37°C pendant 30 minutes,
- Mesure de l'absorbance au spectrophotomètre à 562nm.
- Un dégradé pourpre est obtenu :



Annexe 3 - Tableau comparatif de trois niveaux de résultats

	Canule correspondant à l'échantillon prélevé	Cuve à spectrophotomètre correspondant à l'échantillon à doser
Aucune absorbance à 562nm		
Faible absorbance à 562nm		
Forte absorbance à 562nm		

*Faculté de Pharmacie,
Université Grenoble Alpes.*



Serment de Galien



« Je jure en présence des Maîtres de la Faculté, des Conseillers de l'Ordre des Pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque ».

LE NETTOYEUR A VAPEUR A-T-IL UNE PLACE DANS LA PRISE EN CHARGE DES
DIPOSITIFS MEDICAUX REUTILISABLES A CORPS CREUX EN STERILISATION ?

RESUME

Au Centre Hospitalier Universitaire de Grenoble Alpes, la propreté des dispositifs médicaux réutilisables est contrôlée visuellement à l'œil nu ou à la loupe avant l'étape de stérilisation. Cependant, ce contrôle s'avère insuffisant voire irréalisable pour les dispositifs médicaux à corps creux. L'objectif de notre étude est d'évaluer l'efficacité du pré-nettoyage avec le nettoyeur à vapeur versus le bac à ultrasons afin de valider le processus de nettoyage de ces dispositifs médicaux.

Grâce à la méthode de dosage protéique à l'acide bicinchoninique (méthode au BCA), nous avons réuni un faisceau de preuves d'une meilleure efficacité du nettoyeur à vapeur par rapport au bac à ultrasons pour le pré-nettoyage des dispositifs médicaux à corps creux souillés par du sang. Néanmoins, une collaboration avec les fournisseurs du nettoyeur à vapeur est requise pour rendre son utilisation plus reproductible et plus sûre pour les utilisateurs.

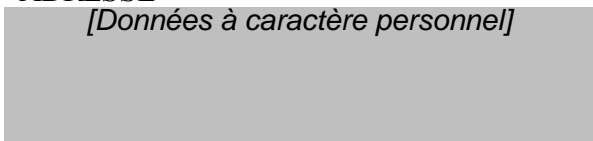
Notre travail a également permis d'objectiver que les dispositifs médicaux non écouvillonnables doivent être remplacés par de l'usage unique puisqu'il est impossible d'en garantir un niveau d'assurance propreté satisfaisant et sécuritaire pour le patient. Ainsi, la conception d'un dispositif médical impacte directement son aptitude à être correctement nettoyé. Une collaboration, entre les utilisateurs et les industriels concepteurs, devrait aider dans cette démarche pour autant que les utilisateurs signalent les difficultés rencontrées et leurs contraintes.

LES MOTS CLES

Dispositifs médicaux à corps creux, Nettoyage, Dosage des protéines résiduelles totales, Méthode BCA, Stérilisation

ADRESSE

[Données à caractère personnel]



FILIERE

Pharmacie Hospitalière – Pratique et Recherche