



SSSH, Journée de formation continue:
LE LAVAGE EN STERILISATION
Morges, le 18.11.2017

Détection des protéines, quoi de neuf ?

G. Jaquet, resp. technique



PLAN

Détection des protéines:

- Les protéines c'est quoi?
- Références normatives
- Tests de résidus de protéines
- Mise en pratique
- Résultats
- Conclusion

Les protéines c'est quoi?

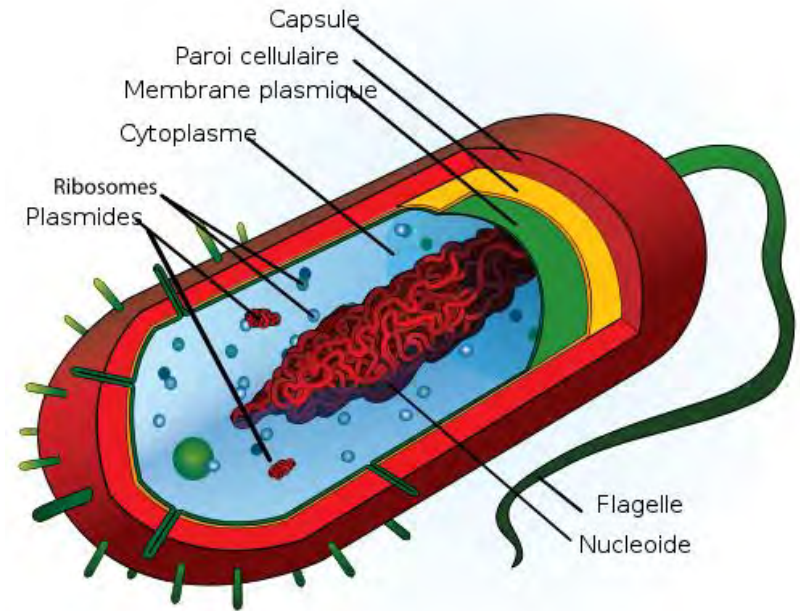
Les protéines sont des macromolécules biologiques présentes dans toutes les cellules vivantes. (Wikipédia)

Elle servent à la construction et le renouvellement des cellules du corps, des fibres musculaires, mais aussi de toutes les autres cellules.

Les protéines sont des composés essentiels de notre corps.

Elle composent notamment le cytoplasme.

Lors de leurs destructions elle libèrent des pyrogènes, molécules qui provoquent la fièvre. (endotoxines et exotoxines)



Références normatives

- SN EN ISO 15883-1:2009 §4.2 Nettoyage

4.2 Nettoyage

4.2.1 Généralités

4.2.1.1 Le nettoyage doit être considéré comme réalisé si les critères d'acceptation pour la méthode d'essai de 6.10 et dans les parties subséquentes correspondantes de l'ISO 15883 ont été remplis.

La méthode d'essai pour les essais de type et opérationnels (6.10.2) doit utiliser l'une des souillures d'essai et méthodes publiées au niveau national, comme décrit dans l'ISO/TS 15883-5 (voir également les références de [24] à [39]).

NOTE 1 L'ISO/TS 15883-5 comprend la description de méthodes d'essai incluant leurs souillures d'essai qui sont actuellement utilisées dans différents pays.

NOTE 2 La vérification supplémentaire comme quoi l'efficacité de nettoyage requise a été atteinte pendant l'essai opérationnel peut être fournie par l'utilisation d'une des méthodes, pour la détection et l'évaluation de protéine résiduelle, données en 6.10.3 et dans l'Annexe C.

NOTE 3 Un essai pour protéine résiduelle est effectué afin de déterminer l'efficacité de nettoyage sur des dispositifs médicaux utilisés mais peut également être utilisé avec une souillure d'essai protéinique.

La méthode d'essai pour la qualification des performances de l'efficacité de nettoyage est décrite en 6.10.3 et doit inclure l'utilisation d'une des méthodes pour la détection et l'évaluation de la contamination protéique résiduelle donnée à l'Annexe C.

NOTE 4 Les trois méthodes d'essai pour les activités d'essai de résidu protéique, mentionnées dans l'Annexe C, n'ont pas la même sensibilité. La méthode à la ninhydrine (C.1) et la méthode biuret (C.3) ont des sensibilités similaires mais il convient de les considérer comme un essai limite et semi-quantitatif respectivement. La méthode OPA (C.2) est plus sensible mais nécessite l'utilisation d'un laboratoire. Les méthodes à la ninhydrine et la méthode OPA réagissent avec les groupes amines α et ϵ des protéines; d'autres composés aminés peuvent donner des résultats positifs erronés.

Références normatives

Guide de validation du nettoyage et de la désinfection chimique manuels des dispositifs médicaux : 2014

(Zentral STERILISATION, supplément 2014)

5.2.3 Qualification des performances (QP)

5.2.3.1.2 Méthodes de contrôle du nettoyage

5.2.3.1.2.1 Instruments souillés en conditions réelles

La qualification «pratique» des performances consiste à effectuer des contrôles sur des DMx contaminés en utilisation réelle et présentant diverses caractéristiques, telles qu'articulations et/ou corps creux. Cette manière de procéder permet de tenir compte des conditions réelles influant sur le nettoyage, que ce soit l'utilisation des instruments proprement dite, leur préparation en vue de leur retraitement, ou encore l'emploi ou non de moyens auxiliaires de nettoyage.

La propreté des DMx est évaluée au moyen de contrôles visuels, au besoin en s'aidant d'une loupe éclairante. Les DMx dont certaines surfaces ne peuvent être inspectées visuellement doivent en outre faire l'objet d'un test semi-quantitatif ou quantitatif de détection des protéines (cf. Annexe 8 «Contrôle du nettoyage»).

Si les contrôles visuels mettent en évidence des résidus d'origine incertaine, le test de détection des protéines permettra de distinguer entre souillures résiduelles et corrosion, la corrosion n'étant pas un critère d'évaluation déterminant pour le résultat du nettoyage.

Références normatives

Guide de validation
du nettoyage et
de la désinfection
chimique manuels
des dispositifs
médicaux : 2014

Annexe 9 : Critères d'acceptation pour l'évaluation de la performance du nettoyage

Les critères d'acceptation indiqués ci-après se fondent sur les résultats d'une évaluation de validations de processus de nettoyage et de désinfection mécaniques faites entre 2011 et 2012 (Michels W, Roth K, Eibl R : Evaluation de l'effet détersif sur la base du rapport protéines/surfaces. ZentrSteril 2013 ; 21: 208–211).

1 Critères d'acceptation pour les instruments souillés en conditions réelles

Tous les instruments doivent être visuellement propres. 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.

Lors de l'évaluation, tenir compte de la taille estimée des surfaces échantillonnées.

En visant une quantité résiduelle de protéines inférieure à 3 µg par cm², les critères d'acceptation suivants sont obtenus (cf. tableau).

2 Critères d'acceptation pour les dispositifs d'épreuve de procédé

Tous les dispositifs d'épreuve de procédé (DEP) doivent être visuellement exempts de toute souillure test. Seuls les DEP visuellement propres feront l'objet de tests semi-quantitatifs ou quantitatifs.

Protéine par DEP, albumine de sérum bovin (BSA) :

Valeur limite : > 150 µg à ne pas atteindre ni dépasser

Valeur d'alerte : > 80 ≤ 150 µg

Valeur de référence : ≤ 80 µg

3 Mesures à mettre en place en fonction des résultats de l'évaluation

Souillures visibles sur des instruments utilisés en conditions réelles

Bloquer immédiatement le processus et ne plus utiliser l'instruction de travail. Adapter l'instruction en conséquence et contrôler de nouveau le processus. Tant que cela ne sera pas fait, la qualification des performances est considérée comme incomplète.

Valeur limite pour les DEP

Bloquer immédiatement le processus et ne plus utiliser l'instruction de travail. Adapter l'instruction en conséquence et contrôler de nouveau le processus. Tant que cela ne sera pas fait, la qualification des performances est considérée comme incomplète.

Valeur d'alerte pour les DEP

Il est possible de continuer à utiliser l'instruction de travail, mais celle-ci doit être adaptée sans délai, afin d'atteindre de nouveau la valeur de référence.

Tant que cela ne sera pas fait, la qualification des performances est considérée comme incomplète.

Valeur de référence pour les DEP / instruments souillés en conditions réelles

Le respect de la valeur de référence n'entraîne aucune mesure.

Le dépassement de la valeur de référence sur des instruments souillés en conditions réelles implique soit d'adapter l'instruction de travail en conséquence, soit l'acceptation d'une valeur de référence supérieure, décision qui doit être dûment motivée dans le cadre d'une analyse des risques.

Références normatives

Guide de validation du nettoyage et de la désinfection chimique manuels des dispositifs médicaux : 2014

Tableau relatif à l'annexe 9

Groupe	Instruments types	Méthodologie	Valeur de référence
1	Instruments sans articulations ni corps creux : Curettes, écarteurs	Contrôle visuel	< 10–15 µg/par 4–5 cm ²
2	Instruments avec articulations : Ciseaux, pinces	Détection au moins semi-quantitative des protéines, après élution en sachet PE Elution analogue à celle pour la pince Crible (DEP), uniquement sur la partie de travail, articulation incluse	< 75 µg par instrument (jusqu'à 15 cm de long) < 100 µg par instrument (plus de 15 cm de long) < 50 µg par instrument
3	Instruments à tige coulissante : rongeurs	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	< 100 µg par instrument < 50 µg par instrument
4	Instruments creux (instruments à gaine), instruments : instruments MIC	Détection quantitative, p. ex. : – gaine d'un instrument démontable échantillonnée uniquement à l'intérieur (rinçage) – chacune des pièces de travail, éluées p. ex. dans tuyau fermé des deux côtés – uniquement mors avec articulation, en éprouvette à l'aide d'ultrasons	< 75 µg par instrument (gaine jusqu'à 4 mm de diamètre intérieur) < 100 µg par instrument (gaine de plus de 4 mm de diamètre intérieur) < 50 µg pièce de travail < 40 µg par mors avec articulation
5	Instruments MIC	Détection quantitative des protéines, après élution de l'instrument complet	< 50 µg par instrument < 20 µg par instrument (instruments ophtalmologiques)

Références normatives

- Health Technical Memorandum HTM 01-01:

Management and decontamination of
surgical instruments (medical devices)
used in acute care
Part D – Washer-disinfectors

July 2016

The ACDP TSE subgroup's guidance requires that there should be $\leq 5 \mu\text{g}$ of protein *in situ* on the side of any instrument tested. The rationale for each of these elements is as follows:

- The figure of $5 \mu\text{g}$ of protein has been shown to be achievable by effective cleaning processes. There is currently no definitive evidence base to link this with the absence of prion transmission risk, which is why lower levels for instruments making contact with high risk tissues (see ACDP TSE's [Annex J](#)) is necessary.
- The measurement is per side of instrument rather than per unit area of an instrument. Prion proteins have been shown to be infectious by contact (Kirby et al.2012). Infection transmission would be related to the total area of an instrument that makes contact with patient tissues. Thus, while not a perfect relationship, the assessment of protein levels per side of an instrument is likely to be a greater predictor of risk control than an assessment based on a unit area of an instrument.
- Protein levels on an instrument should be measured directly on the surface rather than by swabbing or elution (see the ACDP-TSE Subgroup's [Annex C](#) paragraph C23), as detection of proteins on the surface of an instrument gives a more appropriate indication of cleaning efficacy related to prion risk (see Table C2 in ACDP TSE's [Annex C](#)). As technologies become available that are able to detect residual protein *in situ* to $\leq 5 \mu\text{g}$ per instrument side, they should be adopted. Prion proteins are very hydrophobic and will, once dry, adhere strongly to surfaces and resist removal by swabbing or elution for the purpose of protein detection.

What SSDs can do to ensure implementation of the ACDP TSE's Subgroup's recommendations

Because of the risks of prion transmission, there is a need to optimise the whole of the decontamination pathway of surgical instruments.

Reducing the time from close of procedure to reprocessing

Prions are easier to remove if they have not dried on the surface of an instrument. To enable efficient prion removal, theatre and SSD staff should ensure that instruments are transported to the SSD immediately after the close of the procedure, for cleaning and reprocessing as soon as practically possible. This will make the cleaning process more effective, hence reducing the risks to the patients and staff handling the devices. If devices cannot be returned in a timely manner, it is important that the instruments are kept moist using appropriate methods approved and verified by the SSD.

Cleaning validation and continuous monitoring

Traditionally, cleaning validation has been about removing visible soiling. Now the emphasis is on removing highly adherent proteins to very low levels. To be able to have a greater chance of removing these sticky proteins, there needs to be as efficient a cleaning process as possible – therefore SSDs need to both optimise the cleaning performance of washer-disinfectors and remain within the validation parameters.

It is important to continuously monitor the residual protein on reprocessed instruments. SSDs should not view the $5 \mu\text{g}$ limit as a single pass or fail, but rather use it as a way of working towards and below this value, that is, as part of trend analysis and a quality assurance system whose aim is to monitor not just the cleaning efficacy of washer-disinfectors but also the instrument journey leading up to that stage – in other words, ensuring results are being monitored and actions are being taken based on these results. SSDs should include:

Références normatives

Projet de révision de la SN EN ISO 15883-5

Essais de souillures et méthodes pour démontrer l'efficacité de nettoyage

- ISO CD15883-5

4.4.3.2 Protein assay criteria

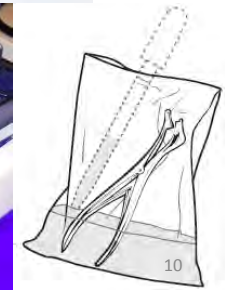
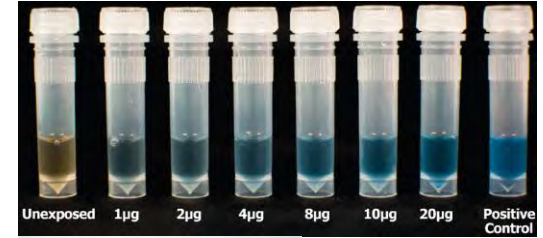
The alert and action level criteria for the protein assay are:

- Alert level, $\geq 3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$.
- Action level, $\geq 6.4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$.

TESTS de résidus de protéines

3 types:

- Ecouvillons
- Equipements électroniques
- Solutions de trempage



TESTS de résidus de protéines

Ecouvillons:

- 3M, Browne, Parasure, Hemocheck

	Avantages	Inconvénients
Ecouvillons	Pratique, utilisation simple, lecture rapide, utilisable sur les corps creux, prix	Parfois nécessite un incubateur, pas toujours facile à interpréter, sensibilité, écouvillonnage pas toujours facile

TESTS de résidus de protéines

Equipements électroniques:

- ProReveal
- 3M™ Clean-Trace™ Luminomètre NG

	Avantages	Inconvénients
ProReveal	Quantification, enregistrement, sensibilité (50ng,10 ⁻⁹)	Prix, consommables, 1 seul côté à la fois, pas adapté aux corps creux et DMx en plastiques
3M™ Clean-Trace™ Luminomètre NG	Plusieurs types d'écouvillons, sensibilité 3µg (/cm ² ?), Quantification, enregistrement	Prix ?, écouvillonnage pas toujours facile, incubateur ?

TESTS de résidus de protéines

Solutions de trempage:

- OneLIFE Detect
- Miele TK/1 (SDS = dodécylsulfate de sodium = détergent et surfactant ionique fort)

	Avantages	Inconvénients
One Life Detect	Nb DMx en 1 seule opération Sensibilité: - le sang : 75 µg/cm ² - le biofilm microbien : 17 µg/cm ²	Odeurs, salissant, pas quantifiable, obligation de relaver les DMx
Miele TK/1	Sensibilité: 10 – 60 µg, possibilité d'interpréter les résultat avec un réflectomètre	Prix ?, env. 25 min / DM!, obligation de relaver les DMx, pas toujours facile à interpréter, méticuleux

Mise en pratique

1 test par solution de trempage:

- Nouvelle méthode
- Détection possible pour 1 plateau entier et donc de nombreux DMx en 1x
- Nombreuses analyses possibles:
 - Identifier les plateaux critiques
 - Identifier les zones contaminées (Mors, tranchants,...)
 - Façon de charger les LD (plateaux dédoublés ou pas)
 - Efficacité machines (comparaison, validation?)
 - Services (provenance)
 - Détergent (type, concentration)

OneLIFE Detect

Mise en pratique



Mise en pratique

Instructions d'utilisation/ mode d'emploi

Se référer aux protocoles d'utilisation et de mise en place

1. Immersion:
 - 5 minutes dans le COLORANT
 - 2 minutes dans l'INDICATOR
2. Rinçage à l'eau
3. Interprétation (se référer au guide d'interprétation)

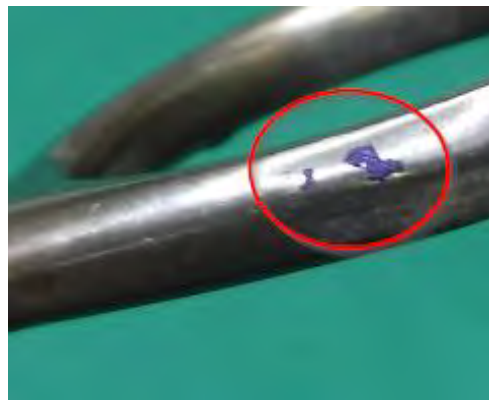
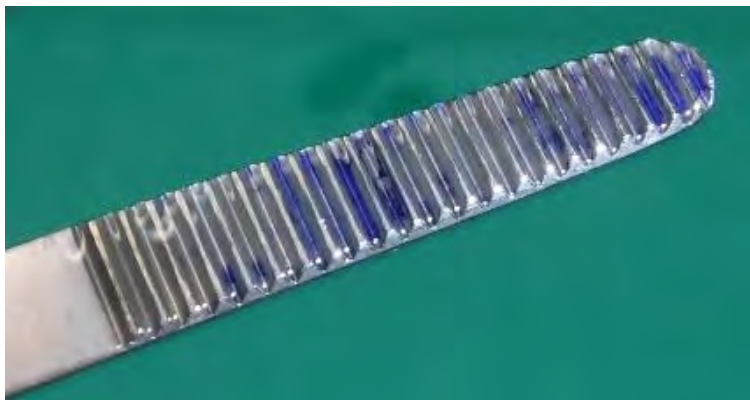
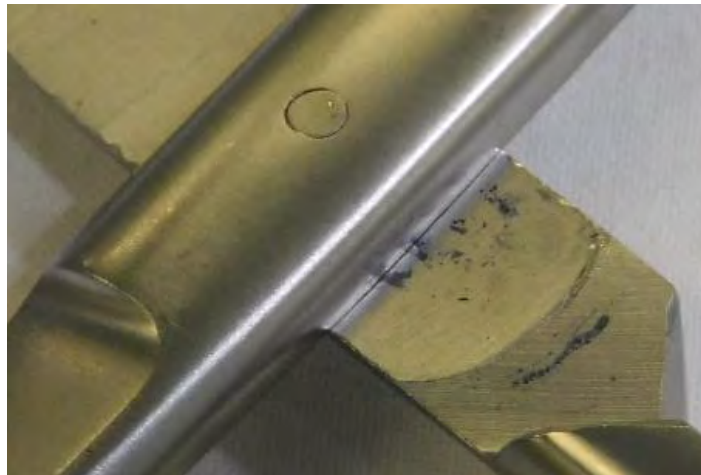
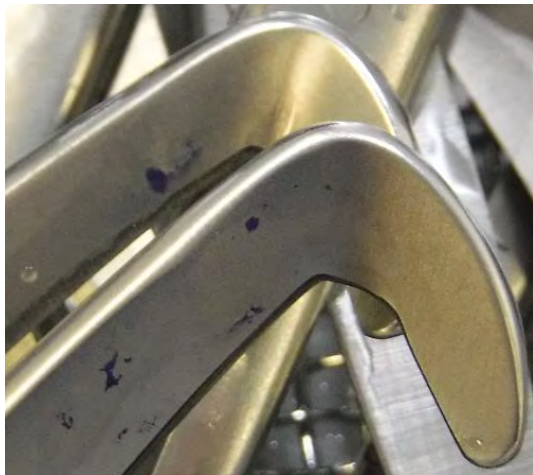


Mise en pratique

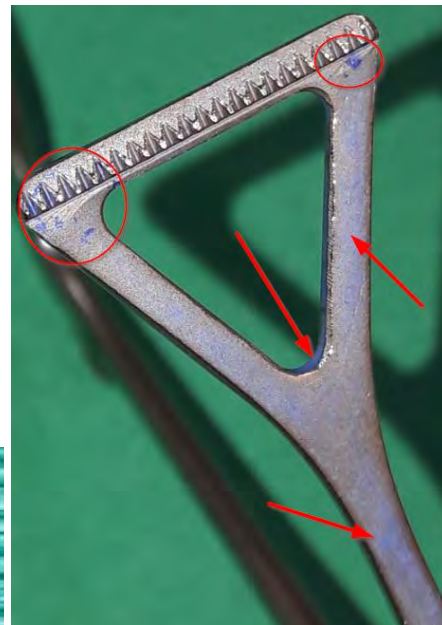
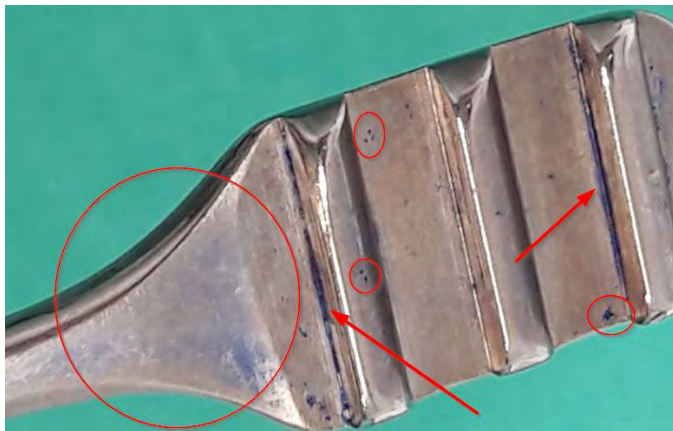
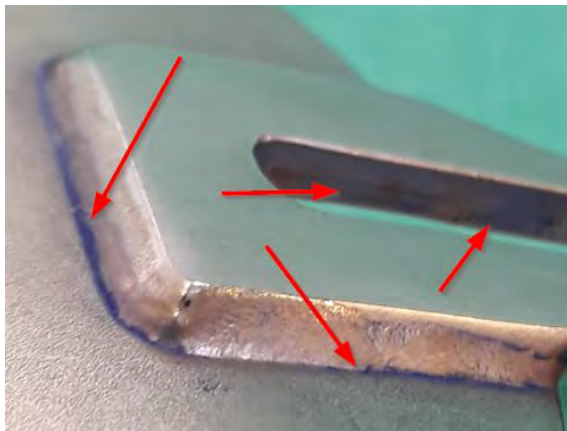
Mise en évidence des protéines par une coloration bleue:



Mise en pratique



Mise en pratique



Mise en pratique

Comment procéder et que veut on tester?

1. Quelques tests pour s'approprier la méthode et se faire 1 idée des performances de nos LD (Tests 1-4)
2. 1 plateau avec 1 grande quantité de DMx et démontrer l'importance ou non de le dédoubler, tjs dans le même LD et avec le même programme (Tests 5-6)
3. Comparatif entre 2 LD de même type (Tests 7)
4. Mesure quantitative des protéines sur DMx critiques, mis en évidence lors des tests précédents

Résultats n°1

1^{er} test: Petite intervention bébé

95 DMx

7 DMx nc

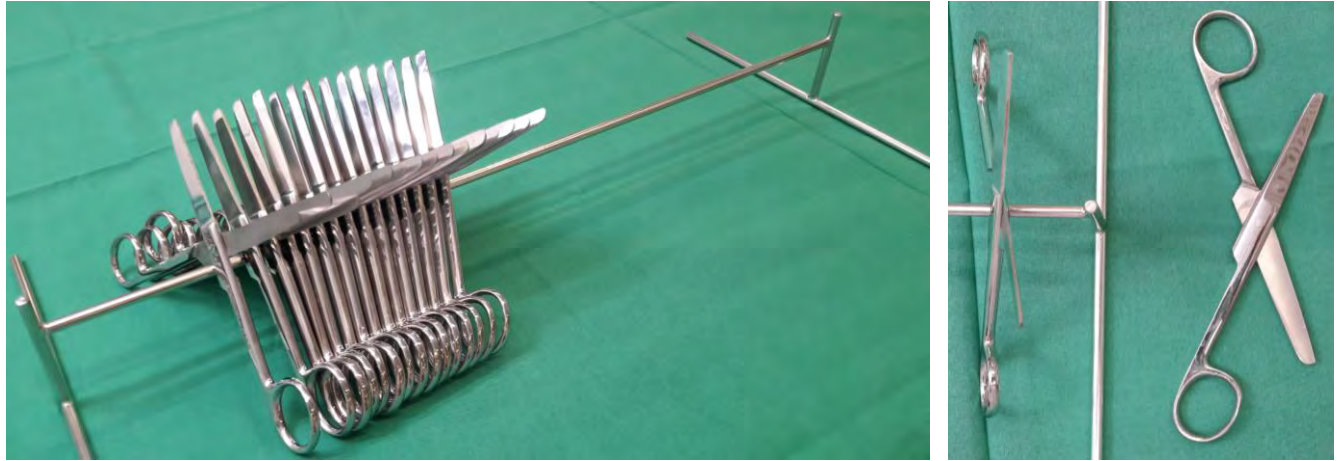
=

7.4% nc



Résultats n°1

2^{ème} test: Support à DMx à articulation



60 DMx

33/42 cx à cordon ombilical nc = 78.5%

4/18 portes aiguille nc = 22.2%

Résultats n°1

3^{ème} test: Cx cordon ombilical dans 1 panier

11 DMx : 0% nc



Résultats n°1

4^{ème} test: Cx cordon ombilical dans 1 panier

21 DMx :

dont



16 cx cordon ombilical: 50% nc

5 cx mayo: 0% nc

Résultats n°2

5^{ème} test: Plateau laparotomie

94 DMx:

19 DMx nc

=

20% nc

9 articulations

7 mors

2 anneaux

4 manches



Résultats n°2

6^{ème} test: Plateau césarienne 53 DMx



Résultats n°2

6^{ème} test: Plateau césarienne

Césarienne	LD	Nb DMx	Nb DMx nc	%
Non dédoublé	T4	53	19	35.8
Dédoublé	T4	53	13	24.5
Dédoublé	T4	53	15	28.3
Détriplé	T4	53	16	30.3
Déquadruplé	T4	53	18	33.9
DMx critiques avec pré lavage US	T4	18 (53)	11 (11)	61.1 (20.7)

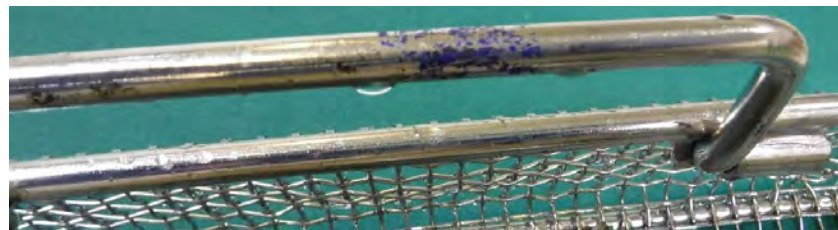
Toujours les mêmes DMx nc: P. à utérus, p. Duval, p. Kocher, valve de Balfour, cx à cordon ombilical, pincette, écarteur de Roux

Résultats n°3

7^{ème} test: Vis + Soil test / comparatif LD

Tunnel n°3 + 4 Steelco TW3000: 12 paniers


Tunnel	Vis	Vis avec Soil test	%	Vis avec Taches	%
n°3	120	0	0	4	3.3
n°4	120	0	0	5	4.1



Résultats n°4

Mesure des protéines

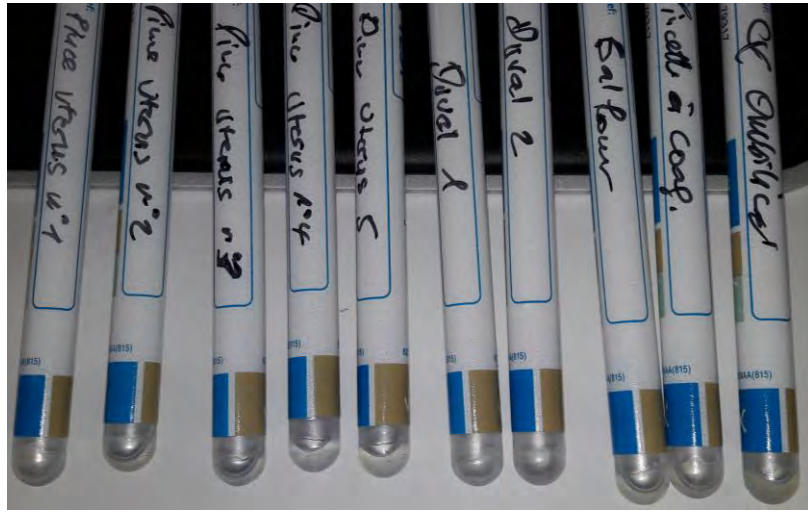
Sur les DMx critiques du plateau césarienne (P. à utérus, p. Duval, éc. Balfour)

Test	LD	Nb de DMx	Nb de DMx nc	Sensibilité
3M Clean Trace	T3	5	0	 ≤ 30µg (15'-20°C) ≤ 3µg (45'-37°C)
	T4	5	0	
Browne Resi Test	T3	10	0	≤ 1µg
	T4	10	0	
Miele TK/1	T3	3	0	Comparatif: < 30µg, 30-60µg, > 60µg ou Réflectomètre: entre 10-60µg / ml
	T4	5	0	

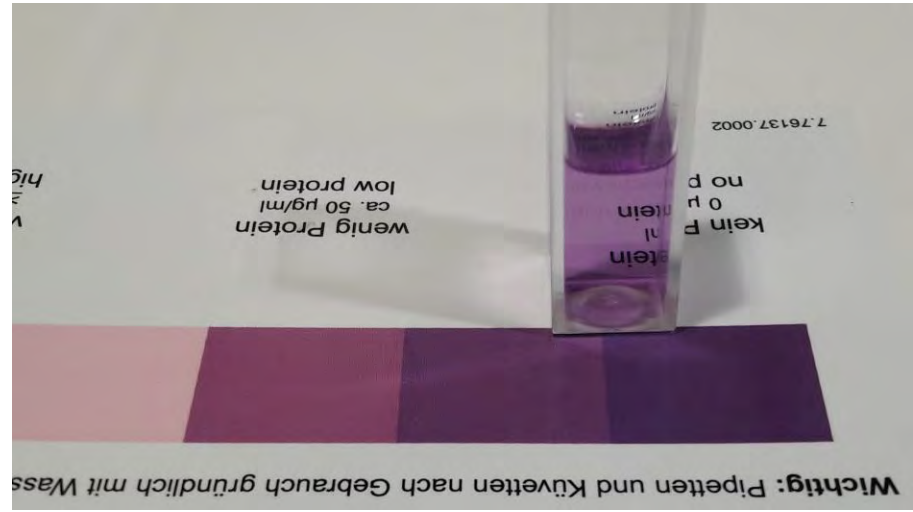
Résultats n°4

Mesure des protéines

Browne Resi Test



Miele TK/1



Conclusions

- Résultats peu concluants
- Le contrôle du nettoyage visuel ne suffit pas
- Résultats différents en fonction du test choisi
- Chaque test à ses avantages et ses inconvénients
- Les normes sont difficiles à appliquer
- Le test idéal n'existe pas!

Conclusions

Questions:

- Quantifier des résidus de protéines sans un équipement électronique ou un labo, est-ce possible?
- Est-ce possible de décoller des protéines par écouvillonnage après une thermo désinfection?
- Comment améliorer mon processus de lavage?
- Comment assurer ce contrôle en routine?
- Quel est le risque?
- ...

Merci à Jonathan Roussel pour son aide précieuse!



Merci à vous toutes et vous tous pour votre attention!

