



advanced cleaning solutions

# Mise au point de détergents éliminant les biofilms

Urs Rosenberg

SSSH, Bienne, 18.06.2015

Projet en coopération avec:



Materials Science & Technology

Avec le soutien de:



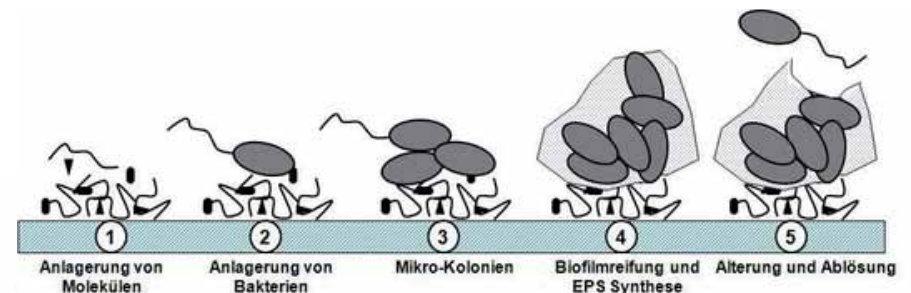
Schweizerische Eidgenossenschaft  
Confédération suisse  
Confederazione Svizzera  
Confederaziun svizra

Kommission für Technologie und  
Innovation KTI



# Biofilms

- Communautés structurées de micro-organismes présentes sur les surfaces ou les interfaces
- Matrice autoproduite de substances polymériques extracellulaires (EPS) composée de polysaccharides, protéines, lipides, acides nucléiques et autres composés.
- Les micro-organismes associés aux biofilms sont jusqu'à 1000 fois moins sensibles aux substances actives antimicrobiennes que leur forme planctonique.



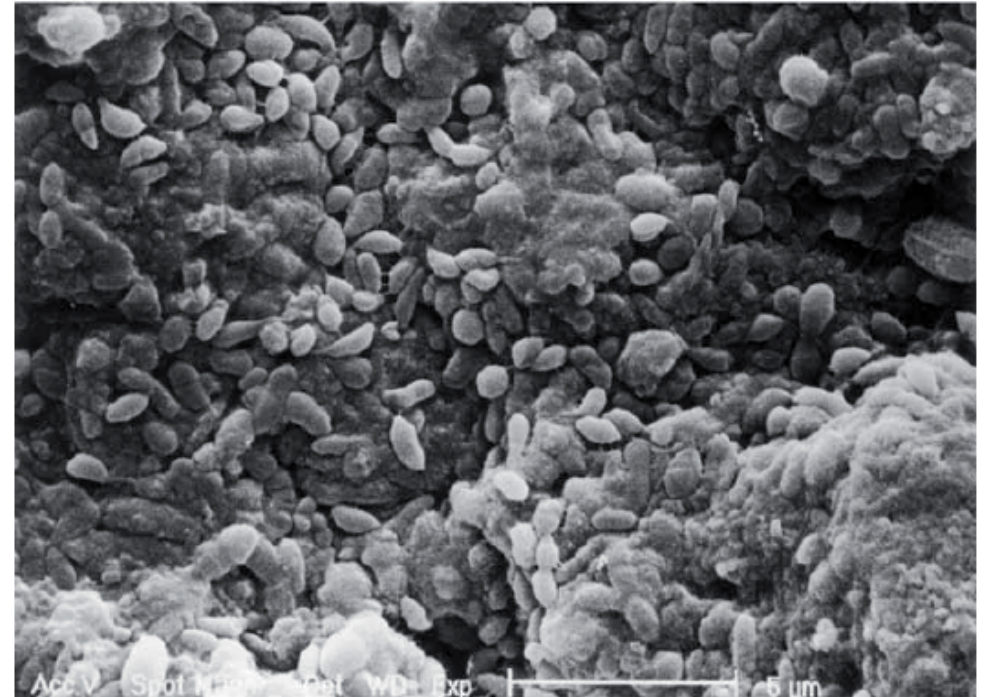
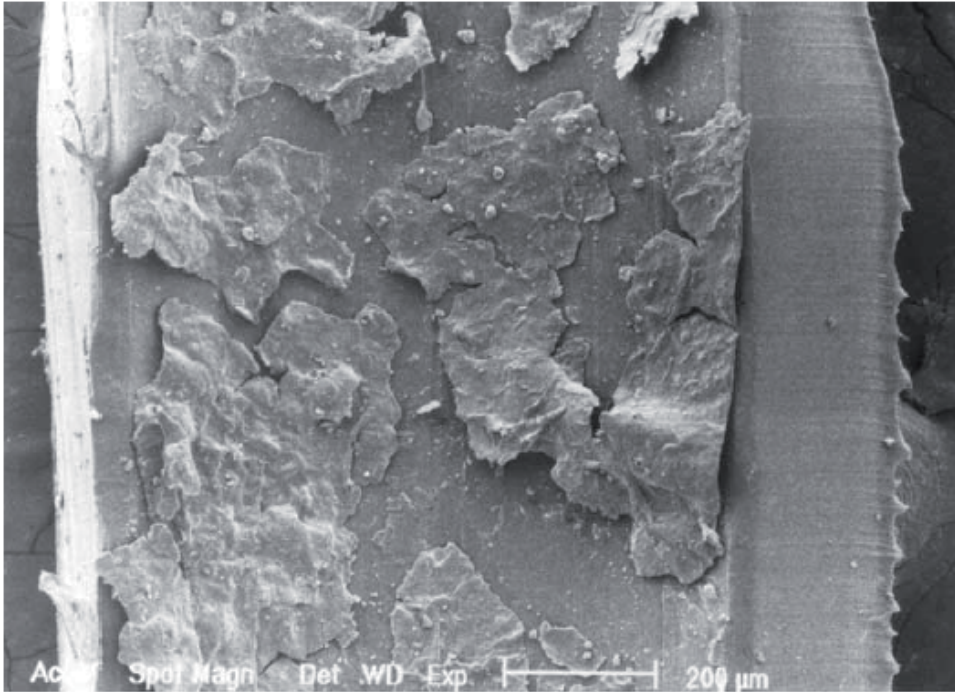
# Endoscopes et infections

TABLE 4 Infections associated with endoscopic retrograde cholangiopancreatography<sup>a</sup>

Reference	Microorganism(s)	No. of contaminated patients after endoscopy	No. of infected patients	Infection(s)	Detection of endoscope contamination	Cause(s) of contamination
95	<i>P. aeruginosa</i>	1	1	Cholangitis, sepsis	Yes	Inappropriate cleaning and disinfection (ethanol)
96	<i>P. aeruginosa</i>	14	0	No	Yes	Inappropriate cleaning and disinfection (povidone-iodine/ethanol)
97	<i>P. aeruginosa</i>	7	7	Cholangitis	Yes	Inappropriate cleaning and disinfection (ethanol)
100	<i>P. aeruginosa</i>	1	1	Sepsis	Yes	Contaminated water bottles
53	<i>P. aeruginosa</i>	4	3	Sepsis	Yes	Inappropriate disinfection; rinsing with nonsterile tap water
91	<i>P. aeruginosa</i>	5	5	Cholangitis, sepsis, urinary tract infection	Yes	Inadequate cleaning and disinfection between uses in patients (tap water)
22	<i>P. aeruginosa</i>	10	5	Cholecystitis, liver abscess	Yes	Contaminated AER; inappropriate cleaning and disinfection; drying with no ethanol flushing
328	<i>P. aeruginosa</i>	1	1	Liver abscess	No	Not found; endoscope reprocessing not described
98	<i>P. aeruginosa</i>	2	2	Sepsis	Yes	Inappropriate cleaning and disinfection (cetrimide)
90	<i>P. aeruginosa</i>	7	7	Bacteremia/sepsis, cholangitis, pancreatitis	Yes	Contaminated water bottle; inadequate manual cleaning and disinfection between patients (isopropanol)
99	<i>P. aeruginosa</i>	5	5	Sepsis	Yes	Contaminated water bottle (not disinfected)
23	<i>P. aeruginosa</i>	16	No data	Bacteremia/sepsis, cholangitis, pneumonia	Yes	Contaminated AER (a flaw in design, presence of biofilm); drying with no ethanol flushing
75	<i>P. aeruginosa</i>	25	25	Bacteremia/sepsis	Yes	Failure to disinfect elevator channel in AER; drying with no ethanol flushing
101	<i>P. aeruginosa</i>	5	3	Cholangitis, sepsis	No	Not found; endoscope reprocessing not described
29	<i>P. aeruginosa</i>	3	3	Sepsis	Yes	Contaminated water bottle; inadequate manual cleaning; insufficient disinfectant exposure
2	<i>P. aeruginosa</i>	3	3	Sepsis	Yes	Presence of biofilm in intact endoscope channels
83	<i>Salmonella</i> Oslo	3	2	Gastroenteritis, sepsis	Not tested	Inappropriate cleaning and disinfection (povidone-iodine/ethanol)
141	<i>Serratia marcescens</i>	1	0	No	Yes	Inappropriate cleaning and disinfection (povidone-iodine)
52	<i>M. chelonae</i>	14	0	No	No data	Contaminated AER; inappropriate disinfection; rinsing with tap water; lack of drying procedure
147	<i>Methylobacterium mesophilicum</i>	1	1	Bacteremia	Yes	Contaminated endoscope channels
144	ESBL-producing <i>K. pneumoniae</i>	16	12	Bacteremia/sepsis, cholangitis	Yes	Contaminated endoscope channels; insufficient drying procedure
145	KPC-producing <i>K. pneumoniae</i>	7	2	Bacteremia	Yes	Contaminated endoscope channels; insufficient drying procedure
184	HCV	1	1	HCV infection	Not tested	Inadequate disinfection (low concn, insufficient exposure); failure to perfuse

<sup>a</sup> AER, automated endoscope reprocessor; ESBL, extended-spectrum  $\beta$ -lactamase; KPC, *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase.

# Biofilm dans les canaux endoscopiques



Clichés MEB de deux canaux air / eau différents porteurs de biofilm:

(a) Couche confluyente de biofilm-souillures (faible résolution).


(b) Biofilm multicouches composé de cellules apparemment saines, entourées et recouvertes d'EPS apparemment amorphes (haute résolution)

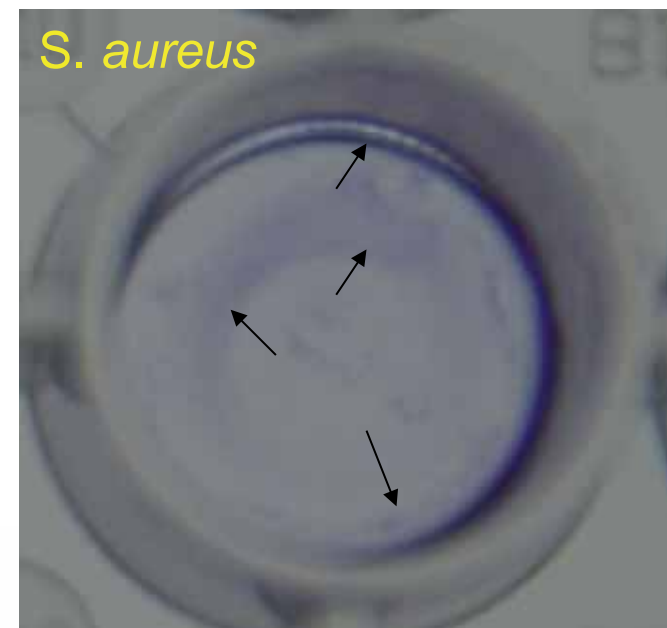
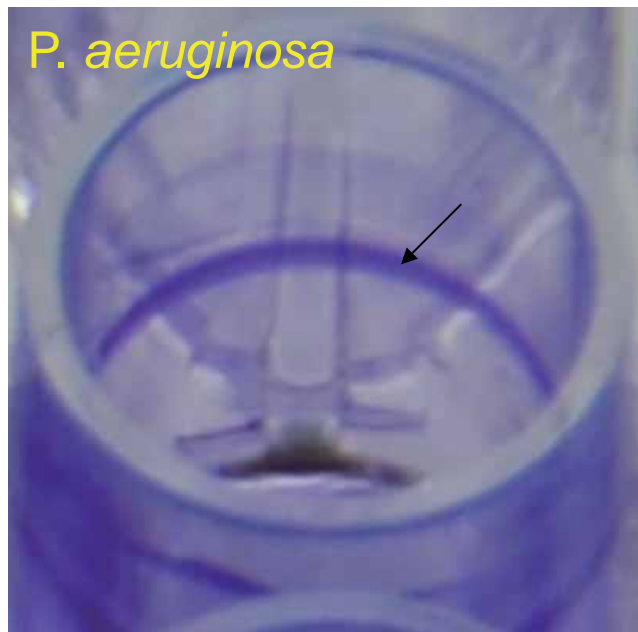
Pajkos et al. 2004

# Modèles de nettoyage




1. Méthodes de screening permettant de tester un grand nombre de formules et paramètres, ainsi que diverses méthodes de mise en évidence
  - Plaques de microtitrage
2. Méthodes plus complexes, plus proches des conditions réelles
  - cellule à flux
  - canaux endoscopiques (EN ISO TS 15883-5)

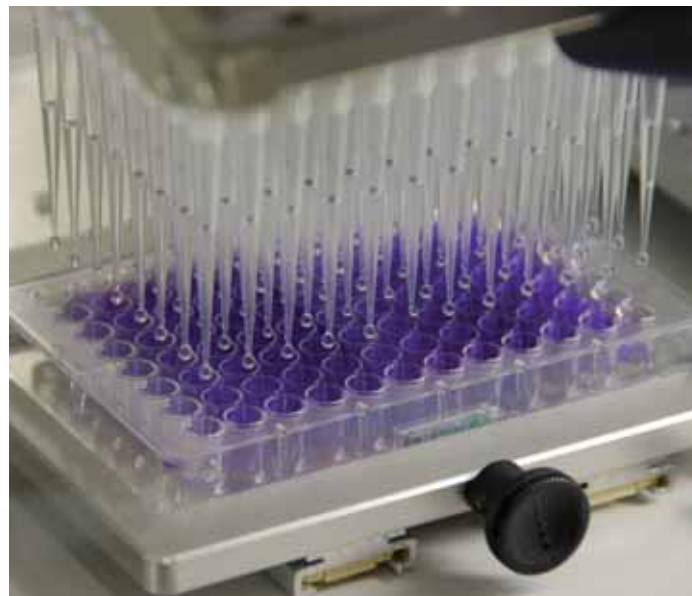
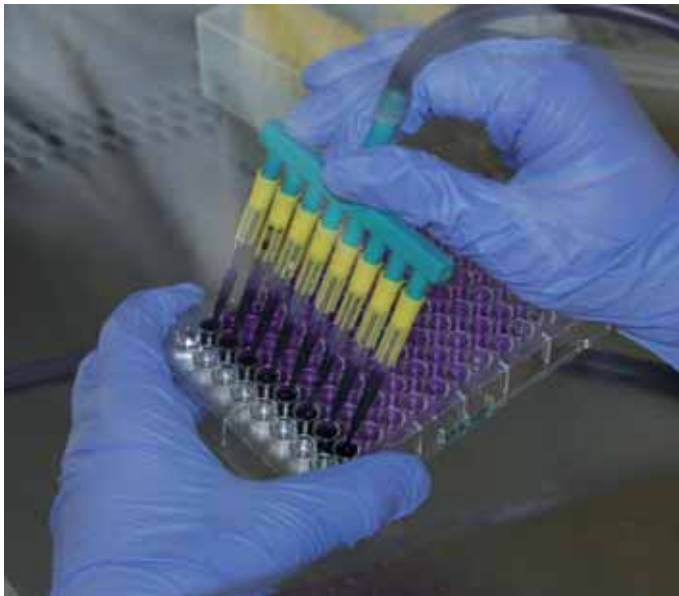
# Biofilms sur plaques de microtitrage

- Plaque de microtitrage à 96 puits polystyrène à fond plat
- Biofilm de culture: dilution de la préculture à 0.2 OD dans 30% TSB + 0.25% Glucose. Incubation de 200  L / puit à 33 °C, sous agitation à 40 rpm pendant 24 heures.
- Apparence biofilm (coloration crystal violet):



# Procédé expérience nettoyage MT-P

- Aspiration du support
- Laver 1x avec 300  L de NaCl 0.9%
- Adjonction de 300  L de solution détergente (1% en WSH: eau à dureté standardisée)
- Incubation pendant 40 min. à 25 °C sans agitation
- Aspiration de la solution détergente
- Laver 3x avec 300  L de NaCl 0.9%
- Méthode de mise en évidence



# Méthodes de mise en évidence potentielles

- Biomasse totale (bactéries et EPS)
  - Crystal Violet (CV)
  - Rouge Safranine
  - Rouge Congo
- Bactéries totales (vivantes et mortes)
  - SYTO 9
  - Orange Acridine
- Bactéries vivantes
  - SYTO 9 / iodure de propidium
  - BacTiter-Glo™ assay (ATP)
  - Turbidity Threshold (susceptibles de se multiplier)
- Protéines
  - CBQCA
  - NanoOrange
  - SYPRO Ruby
  - FITC
- Polysaccharides
  - Calcofluor White
  - ConA-FITC
  - Dubois



# Avantages et inconvénients des méthodes

## Sur plaques de microtitrage

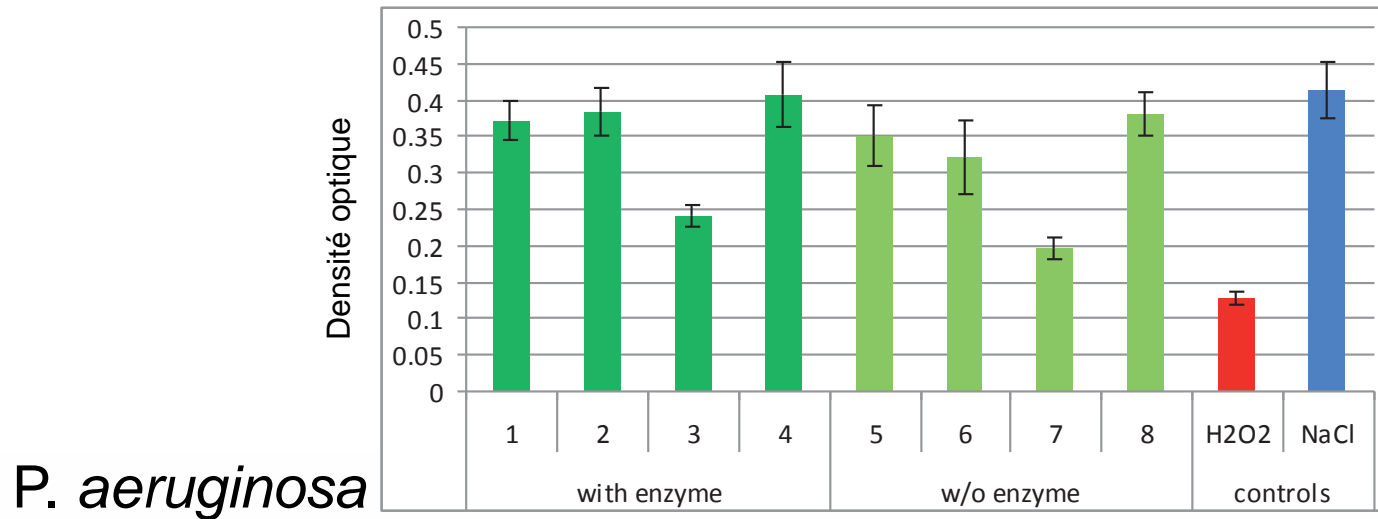
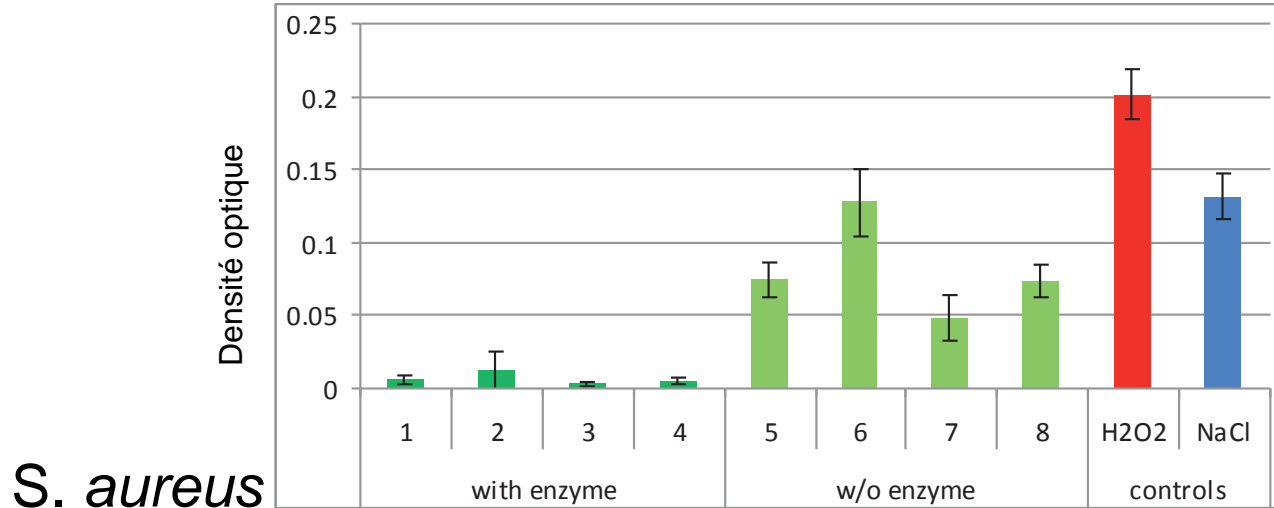
Method	Vorteile	Nachteile
Crystal Violet	Hohes Signal bei rel. niedriger STABW.	Rel. hohe Detektionsgrenze.
Safranin Red	Ähnlich Cristal Violet,	jedoch schwaches Signal.
Congo Red		Sehr schwaches Signal
Syto 9	OK bei <i>S. aureus</i> ,	jedoch rel. hohe STABW. Färbt tote <i>P. aeruginosa</i> überproportional.
Acridin Orange	Rel. niedrige Detektionsgrenze und STABW.	Färbt behandelte Zellen stärker.
Syto 9 / PI	OK bei <i>S. aureus</i> ,	jedoch rel. hohe STABW. Färbt tote <i>P. aeruginosa</i> überproportional.
BacTiter-Glo™	Sehr sensitiv. Hoher dynamischer Range.	Sehr teuer.
Turbidity Threshold	Hoher dynamischer Range. Nicht teuer.	Nicht für kleine Unterschiede. 1 MT-Platte / 12 h.
SYPRO Ruby		Zuviel Signal bei den Kontrollen. Färbt MT-Platten.
FITC	Funktioniert,	jedoch hohe Detektionsgrenze und STABW.
Nano Orange		Einfluss Reinigungsmittel.
CBQCA		Einfluss Reinigungsmittel.
Calcofluor White		Zuviel Signal bei den Kontrollen. Färbt MT-Platten.
ConA-FITC		Zuviel Signal bei den Kontrollen. Färbt MT-Platten.
Dubois		Nicht sensitiv genug im MT-Assay

# Méthodes de mise en évidence / conclusions

- Crystal Violet  
Coloration de l'ensemble de la biomasse (bactéries et EPS)  
→ Réduction du biofilm, sans différenciation EPS/bactéries.
- BacTiter-Glo™  
Coloration différentielle des bactéries vivantes  
→ Réduction et destruction bactérienne, sans différenciation.
- Turbidity Threshold  
Croissance bactérienne ( $OD_{595}$ )  
→ Réduction et destruction bactérienne, sans différenciation .

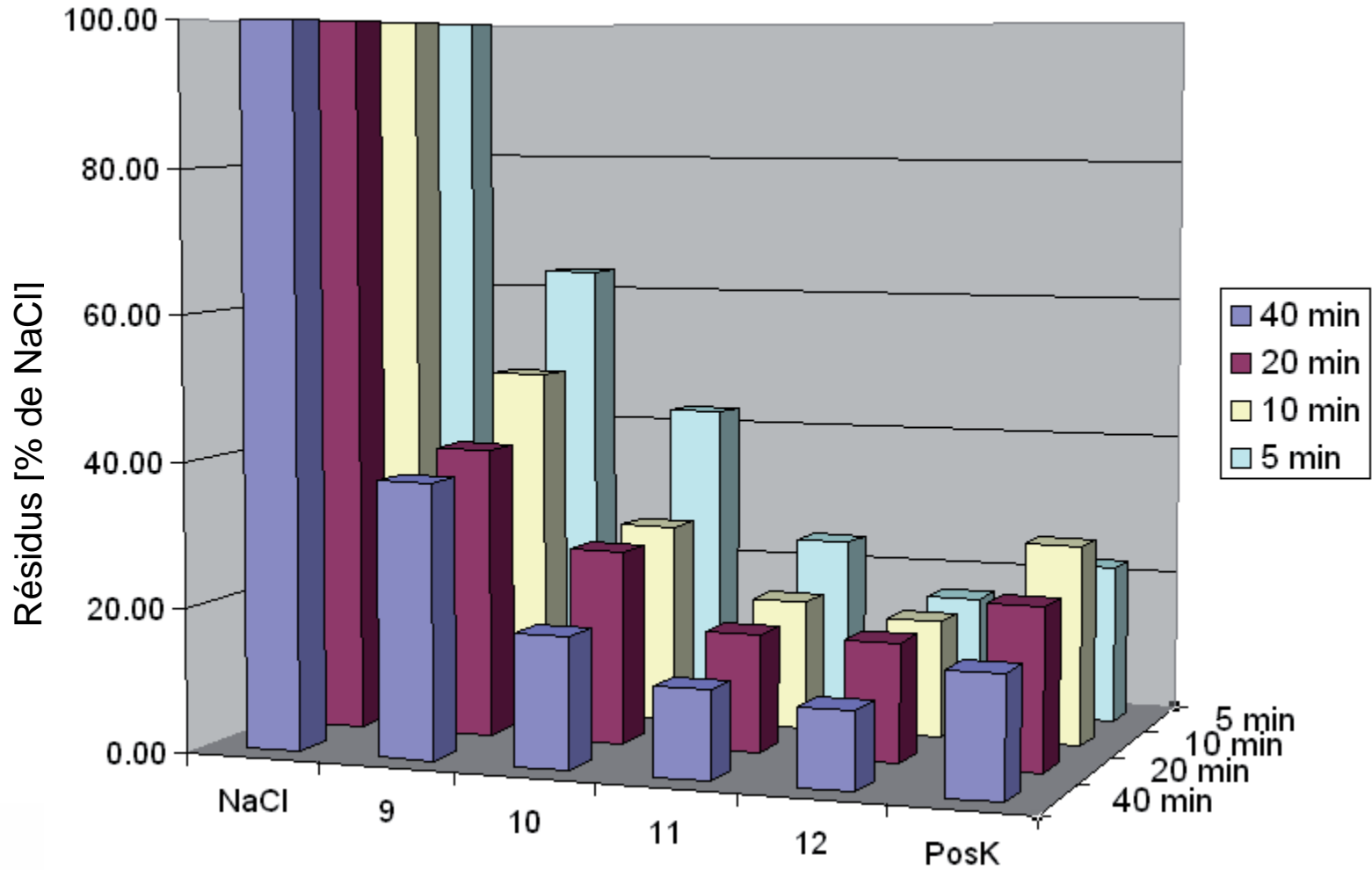
# *P. aeruginosa* / *S. aureus*

Coloration Crystal Violet (CV)



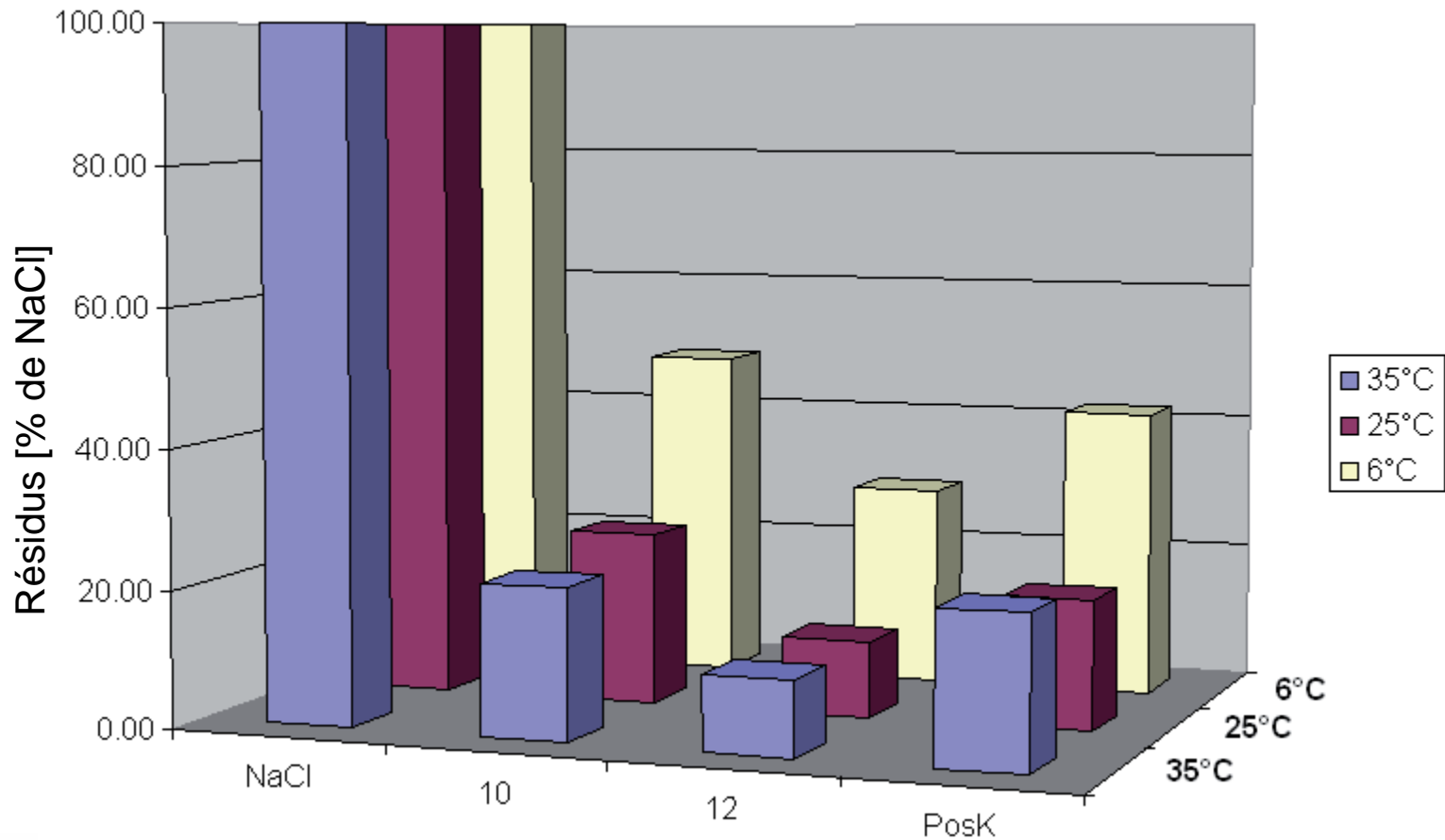
# Durée d'incubation

*P. aeruginosa* (coloration CV)

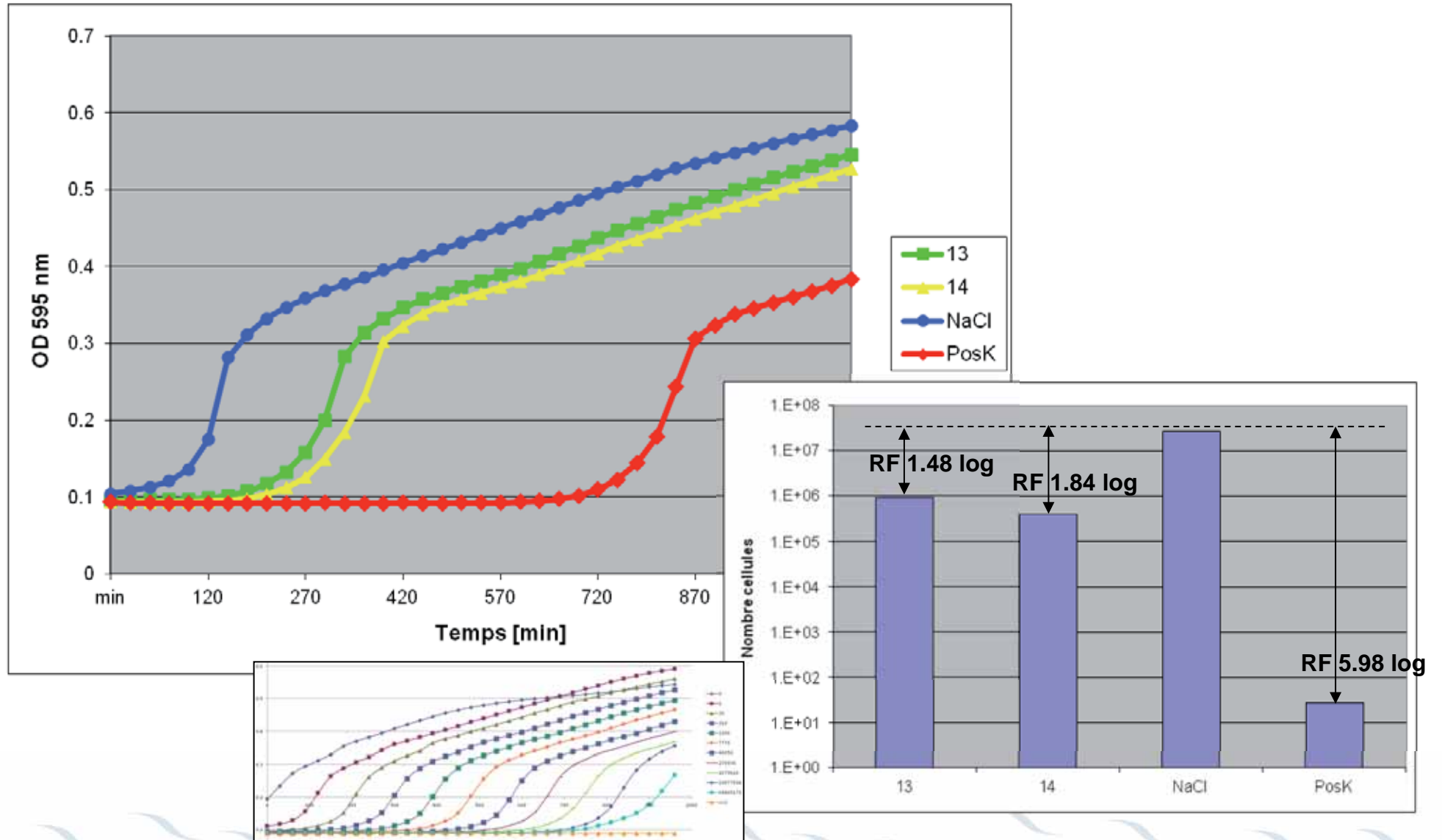


# Température d'incubation

*P. aeruginosa* (coloration CV)



# Croissance (Turbidity Threshold)

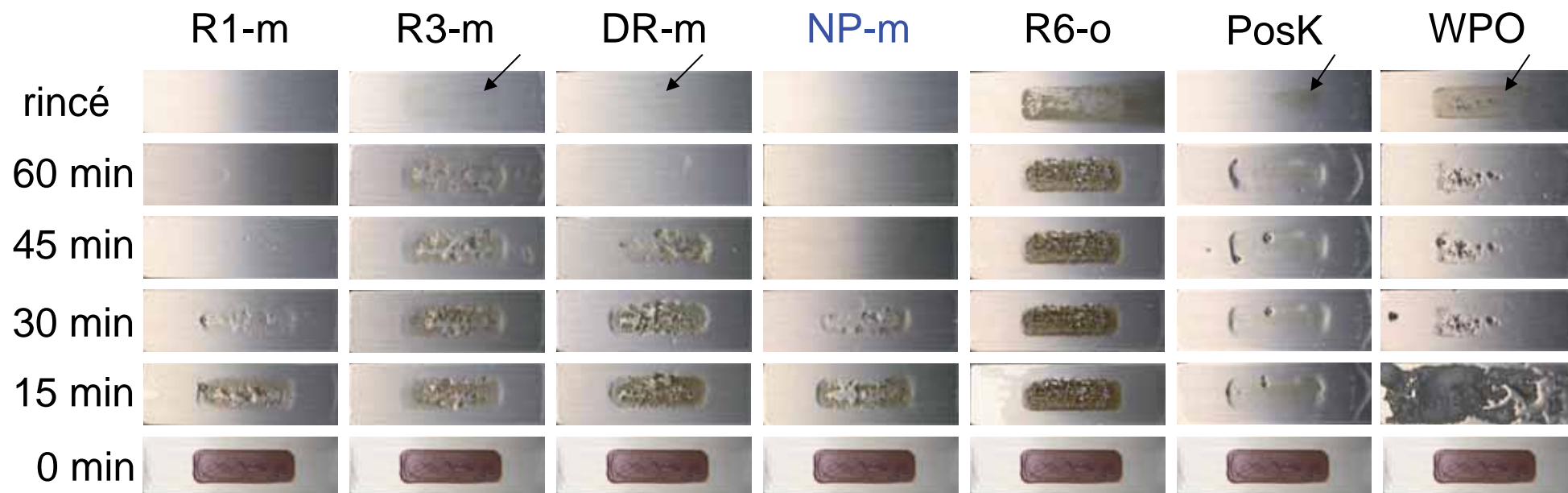


# Produits testés

Code	Enzyme	Auslobung
R1-m	mit	Entfernt zuverlässig Rückstände wie <b>angetrocknetes und denaturiertes Blut</b> , Fette und Sekrete. Bewirkt eine starke Abreicherung organischen Materials und verhindert die Redeposition von Proteinrückständen. Entfernt <b>Biofilme</b> .
R2-m	mit	Ein besonderer Pluspunkt ist das <b>hervorragende Ablöseverhalten von Sekret/Schleim</b> . Hinzu kommt die zuverlässige und gleichzeitig schonende Ablösung hartnäckiger, auch angetrockneter Reste von Blut, Eiweiss, Sekreten, Fett und <b>Biofilm</b> .
R3-m	mit	Geprüfter Effekt gegen <b>Biofilm</b> . Entfernt alle Typen von Verschmutzungen sowohl in weichem als auch in hartem Wasser. <b>Herausragende bakteriostatische and fungistatische Wirkung</b> .
R4-m	mit	<b>Biofilm</b> -entfernendes enzymatisches Reinigungsmittel.
DR-m	mit	Enzymbasierter Hochleistungsreiniger mit <b>desinfizierender Basiswirkung</b> zur Reinigung von Endoskopen und chirurgischen Instrumenten.
NP-m	mit	(Neuer enzymatischer Reiniger)
R5-o	ohne	Reinigungssystem zur <b>selbsttätigen</b> , schonenden Ablösung hartnäckiger Kontaminationen inklusive <b>Biofilm</b> .
R6-o	ohne	<b>Biofilm</b> -Entferner. Bricht die Oberflächen-Adhäsion – bewirkt dass der <b>Biofilm</b> zurückgeschält wird und in sich zusammenfällt. Löst die komplexen Kohlehydrate – EPS auf. Hat in Tests durch Institute Reinigungswirksamkeit gezeigt. Simulierte Verschmutzungstests haben gezeigt, dass das Produkt <b>der weltweit wirksamste Medizinproduktreiniger</b> ist.
NaCl		Negativkontrolle (0.9% NaCl)
PosK		Positivkontrolle (je 1% (w/w) NaOH, NaOCl (13% Aktivchlor → Endkonz. = 0.13%), SDS, EDTA)
WPO		Wasserstoffperoxid (ca. 6% Aktivsauerstoff)
1,2...		Experimentalformulierungen

# Nettoyage TOSI

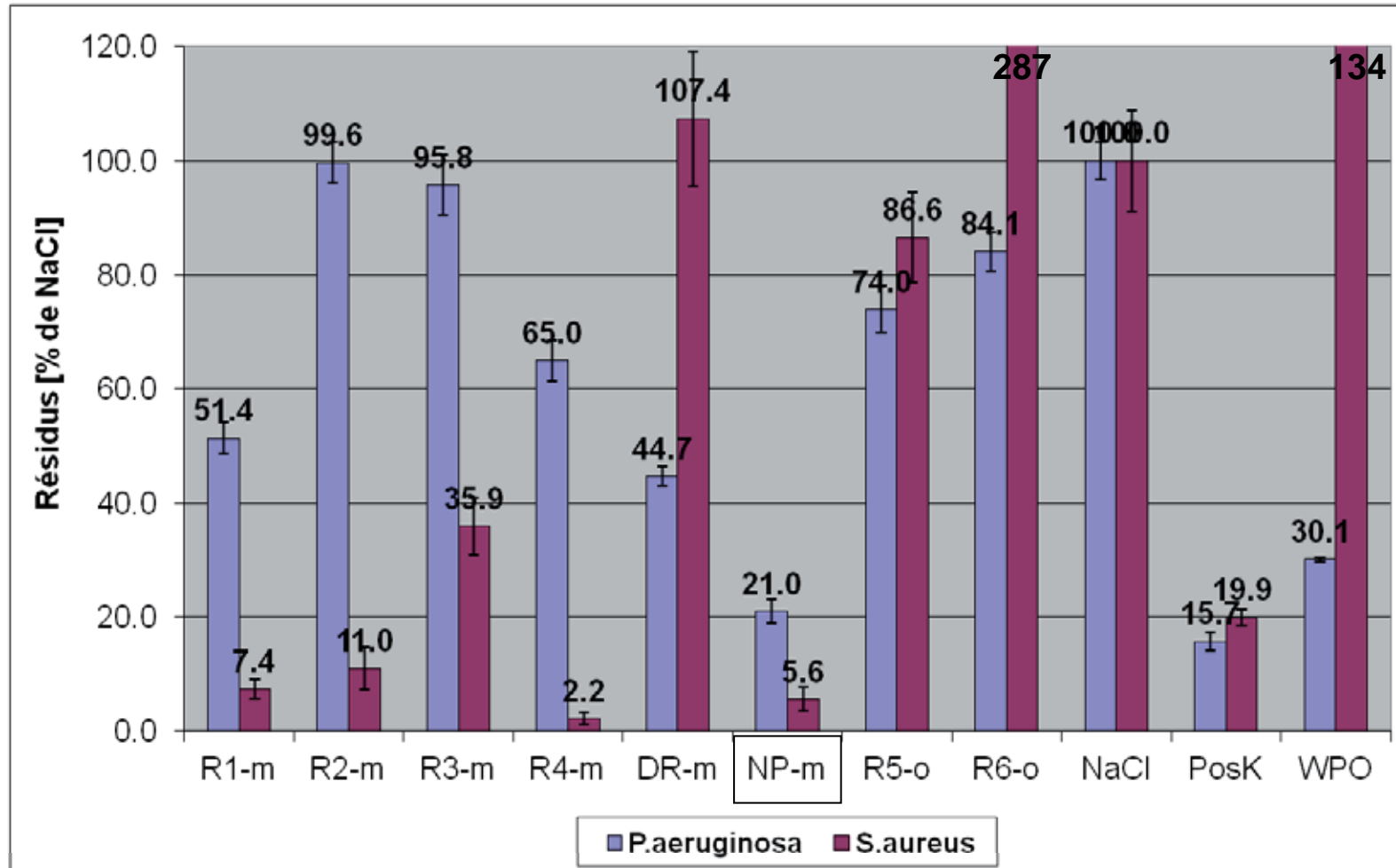
1% dans de l'eau du réseau à environ 16°d à température ambiante (environ 22°C)





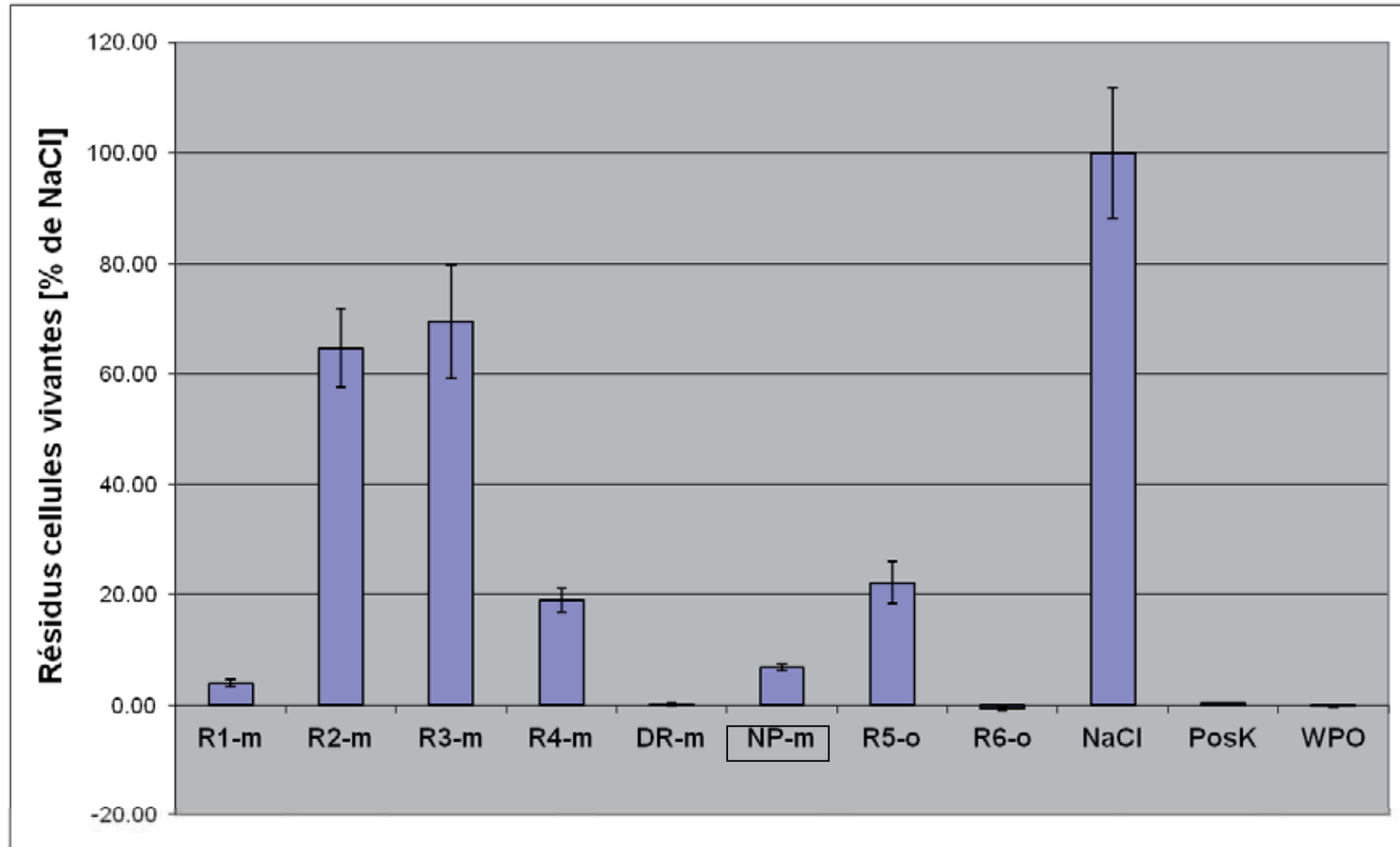
# *P. aeruginosa* vs *S. aureus*

Plaques de microtitrage, réduction du biofilm 40 min statique, coloration CV

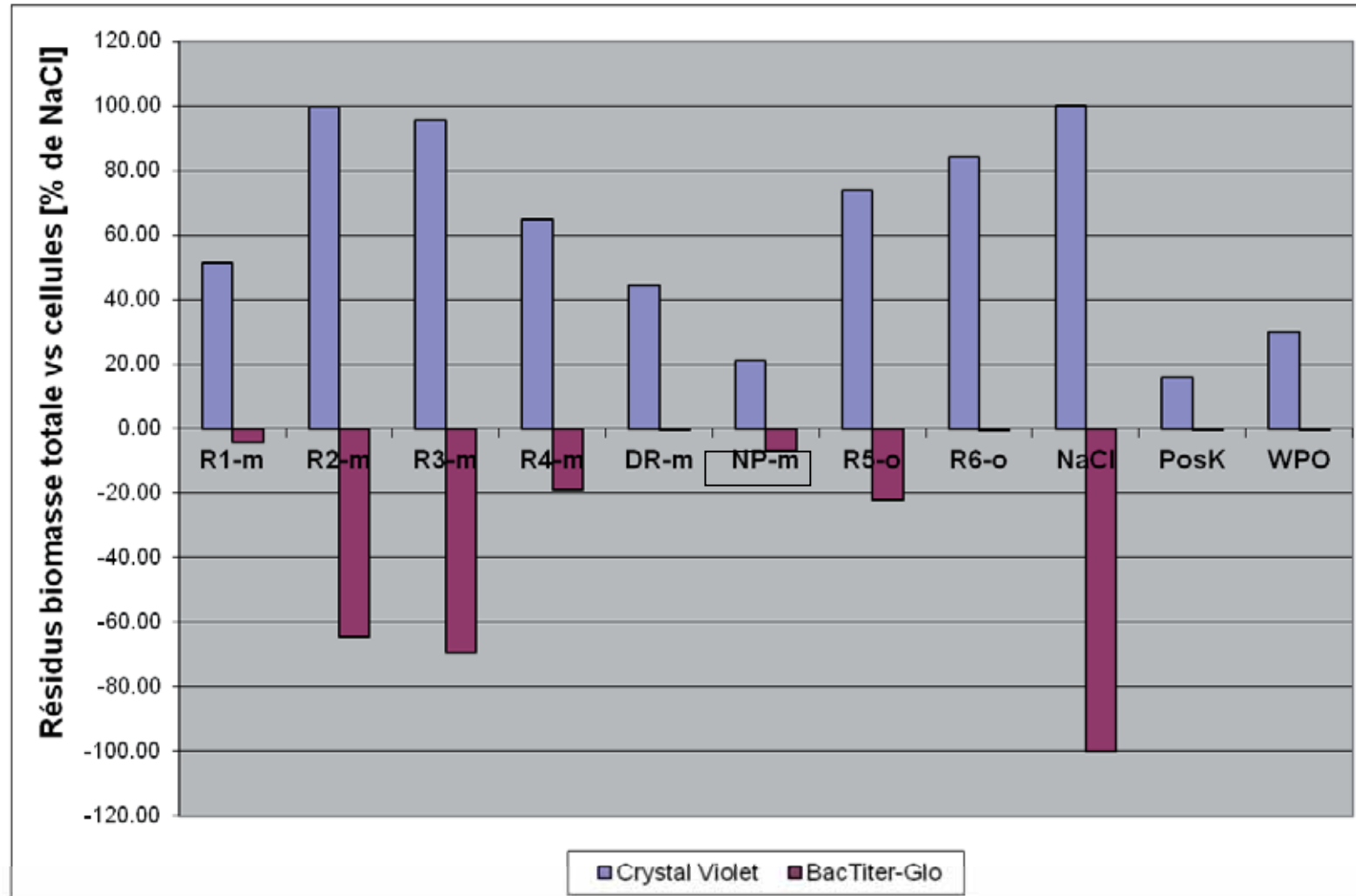


# Cellules vivantes (*P. aeruginosa*)

Plaques de microtitrage, 40 min statique, BacTiter-Glo™



# Réduction biofilm / cellules vivantes

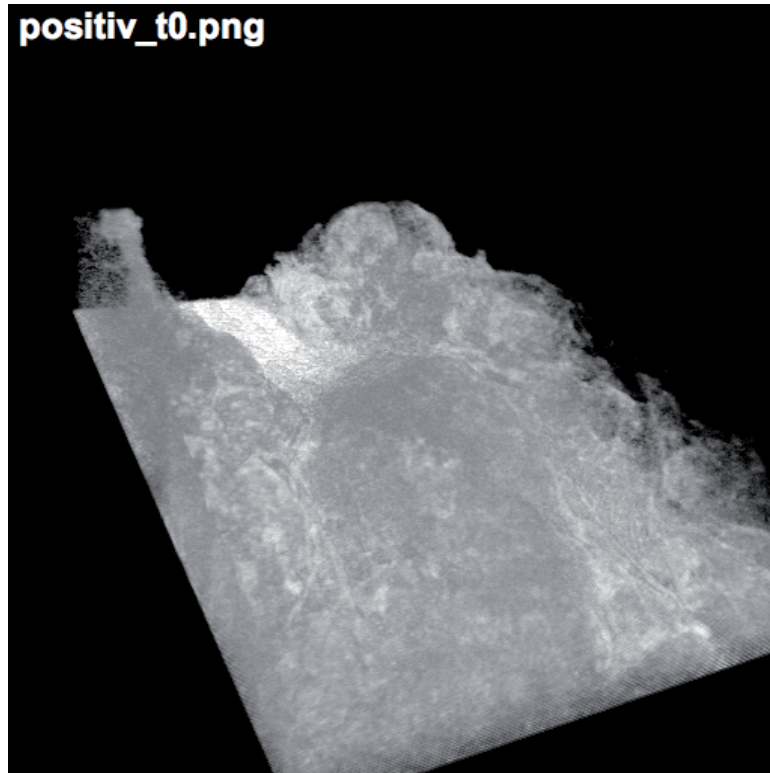


# Cellule à flux avec visualisation TCO

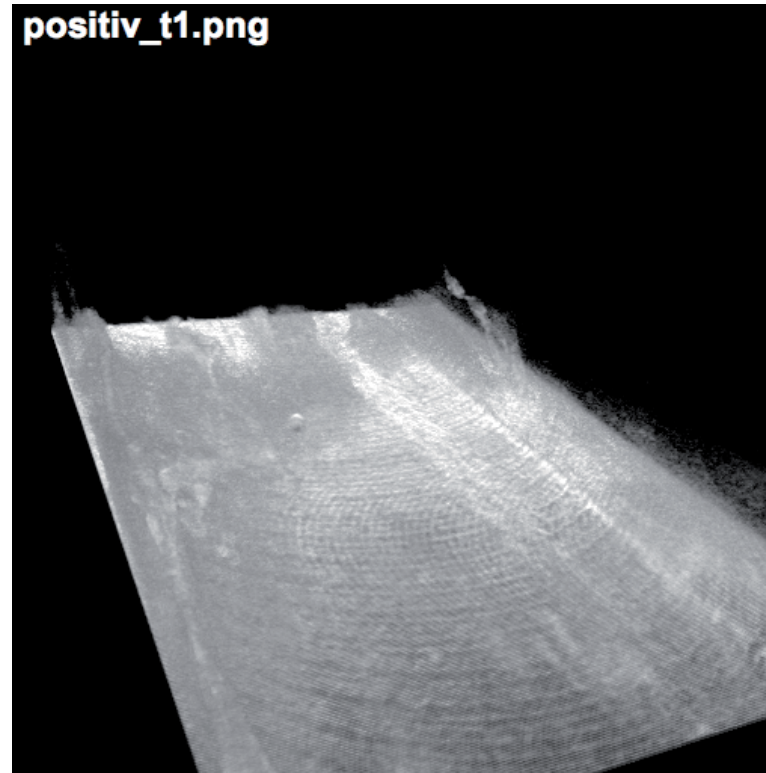
TCO = tomographie en cohérence optique, Procédé d'analyse utilisant la lumière de courte longueur de cohérence afin de mesurer, au moyen d'un interféromètre, la distance de matériaux dispersés. L'objet examiné est palpé ponctuellement. Principal domaine d'application: la médecine.

- Cellule à flux miniaturisée 120x2x1 mm (lxlxh)
- Culture de biofilm d'eaux usées hétérothrophe (source: surnageant de boues activées) 24h en mode Fed-Batch
- Rinçage au NaCl 0.9%
- Essais de nettoyage par écoulement (16 ml/min)
- NP-m et PosK testés

# Visualisation TCO



Avant



Après 10 min traitement avec PosK  
(NaOH, NaOCl, EDTA, SDS , chacun à 1%)


Images 3D  
(3x2x1 mm)  
après rinçage  
NaCl

Image, résolue en temps, de coupes 2D (plans xz)  
dans l'axe d'écoulement (direction x)

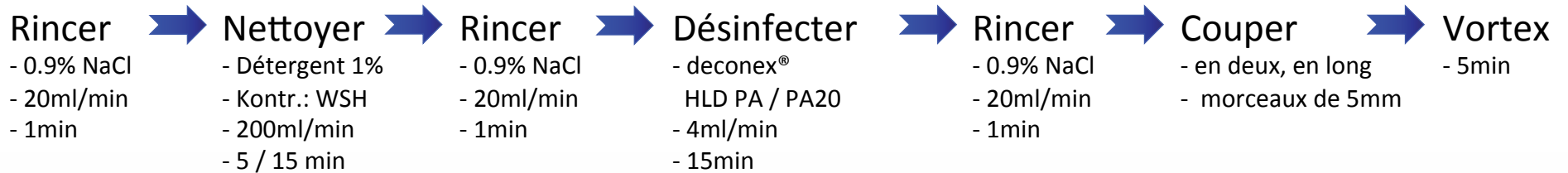


# Test à l'aide d'un endoscope de substitution

EN ISO/TS 15883-5:2005 Annexe F

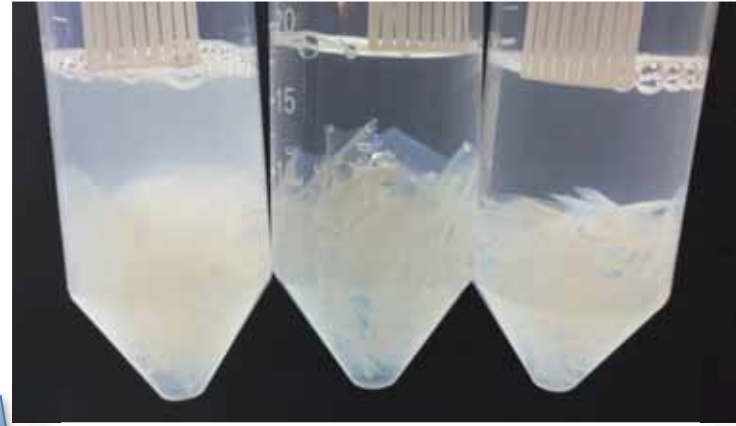
- Remplir le canal d'endoscope (2 m et  4 mm) avec 10 ml de culture *P. aeruginosa* de la veille.
- Culture du biofilm pendant 72 h. à 30°C. Recirculation (40 mL/min) avec adjonction définie de milieu de croissance.
- Rincer le tuyau au NaCl 0.9% pendant 1 min à 20 ml/min.
- Utiliser des segments de 30 cm pour les essais de nettoyage statiques ou par écoulement 200 ml/min ou 4 ml/min (désinfection).
- Analyse OD<sub>595nm</sub>, UFC, mise en évidence de sucre selon Dubois, mise en évidence de protéines selon Lowry.

# Nettoyage: cadre expérimental



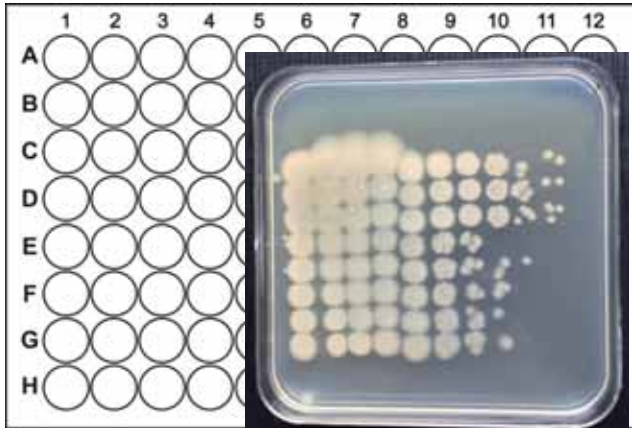
Sans désinfection

# Analyses

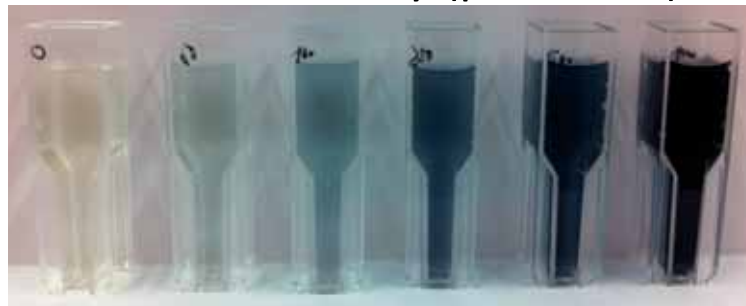


Séries de dilution  
(bactéries)

Sample 150μl  
30μl → 120μl  
30μl → 120μl  
30μl → 120μl ...



Méthode Lowry (protéines)



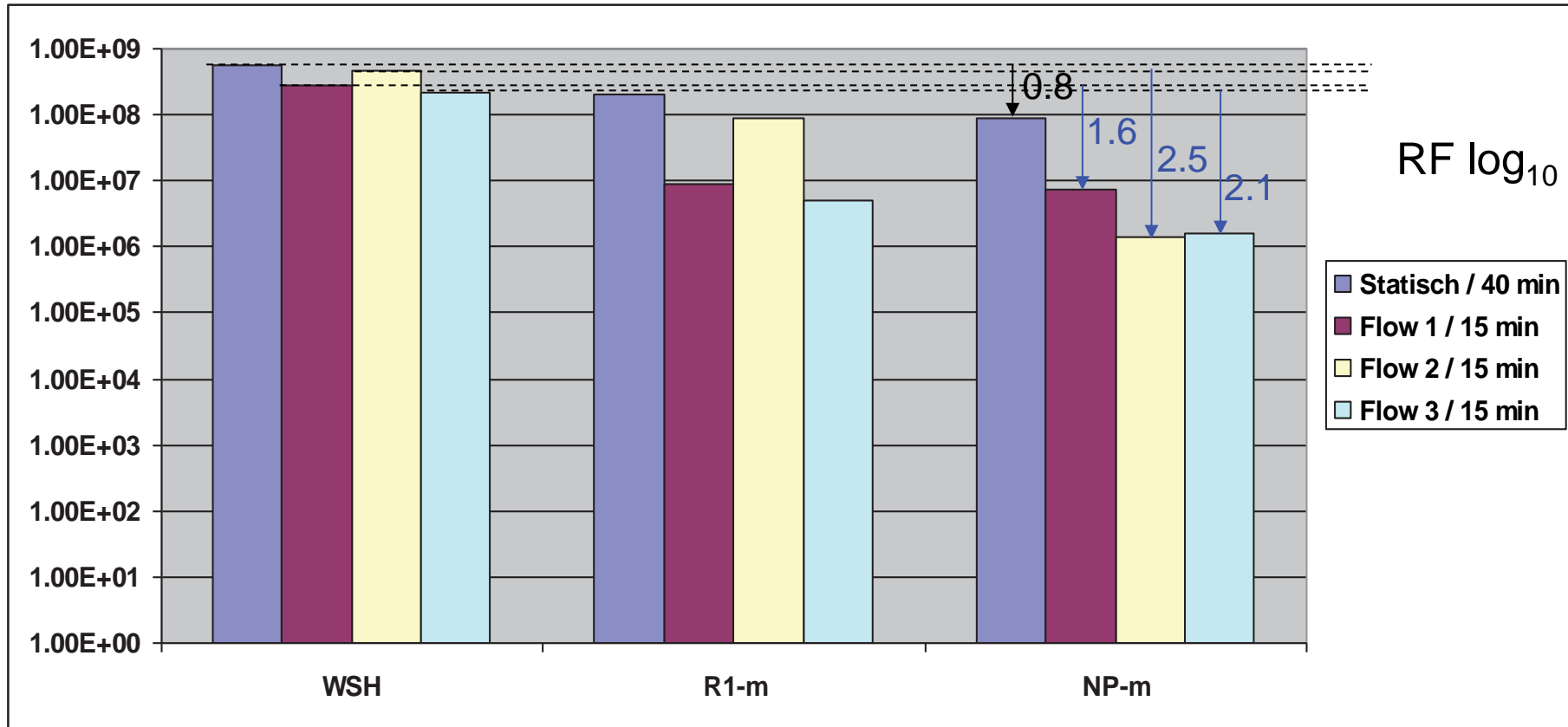
Méthode Dubois  
(sucre)





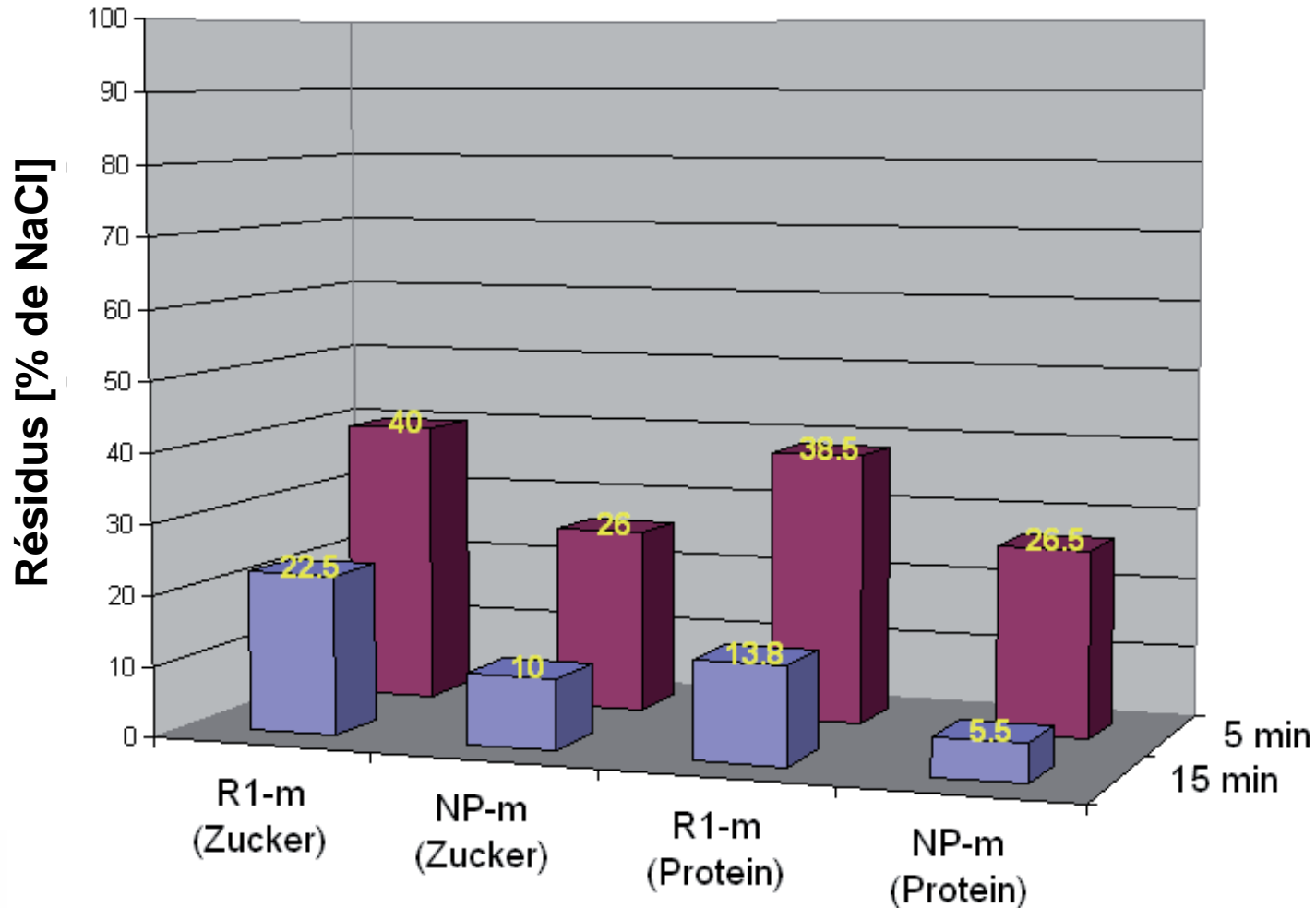
# Nettoyage statique vs par écoulement

Réduction bactérienne: statique = sans pompe; Flow 1, 2, 3 = pompe avec 200 mL/min



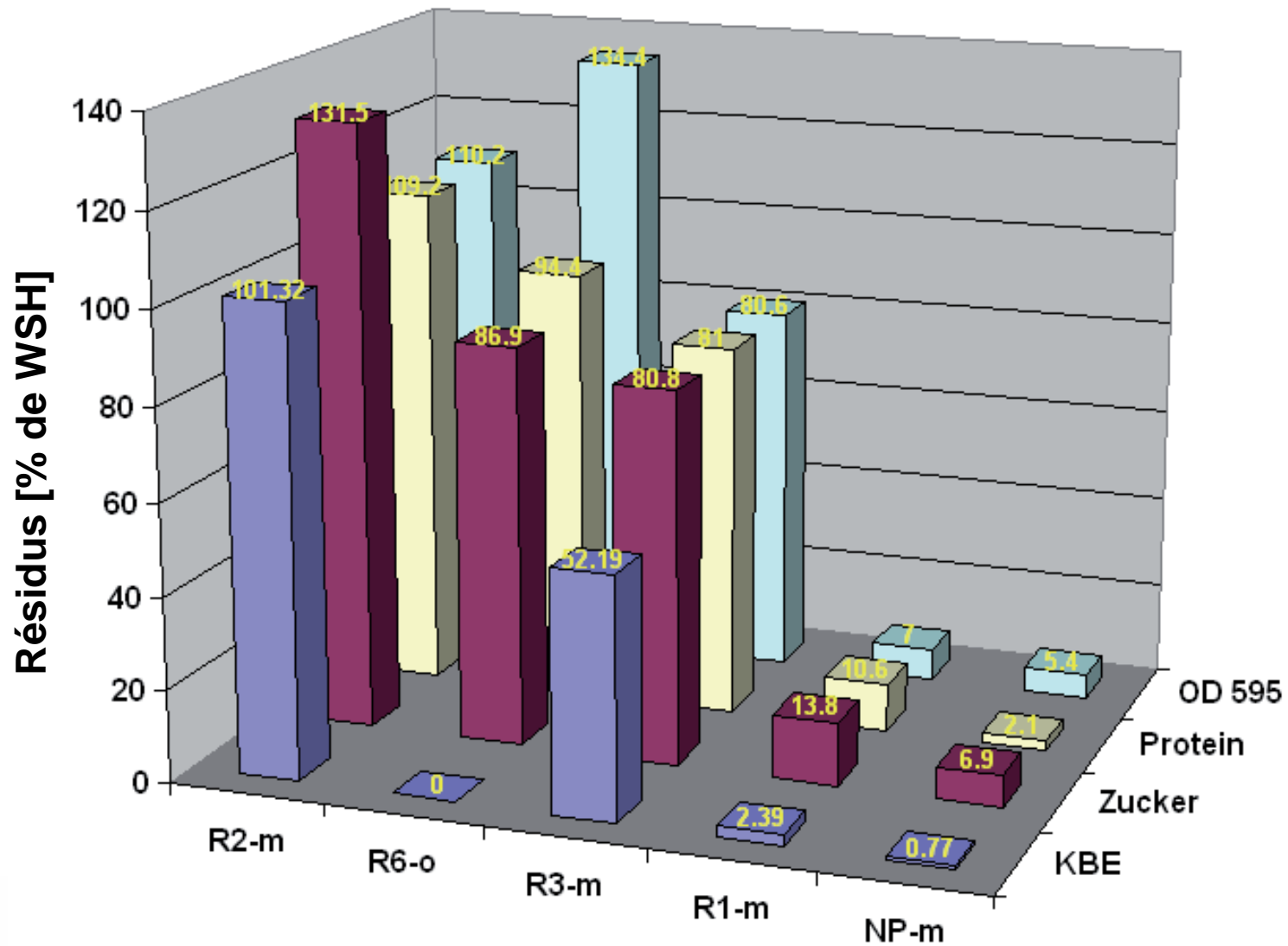
# Nettoyage par écoulement: durée

Réduction protéines, sucre: 5, 15 min, 200 mL/min



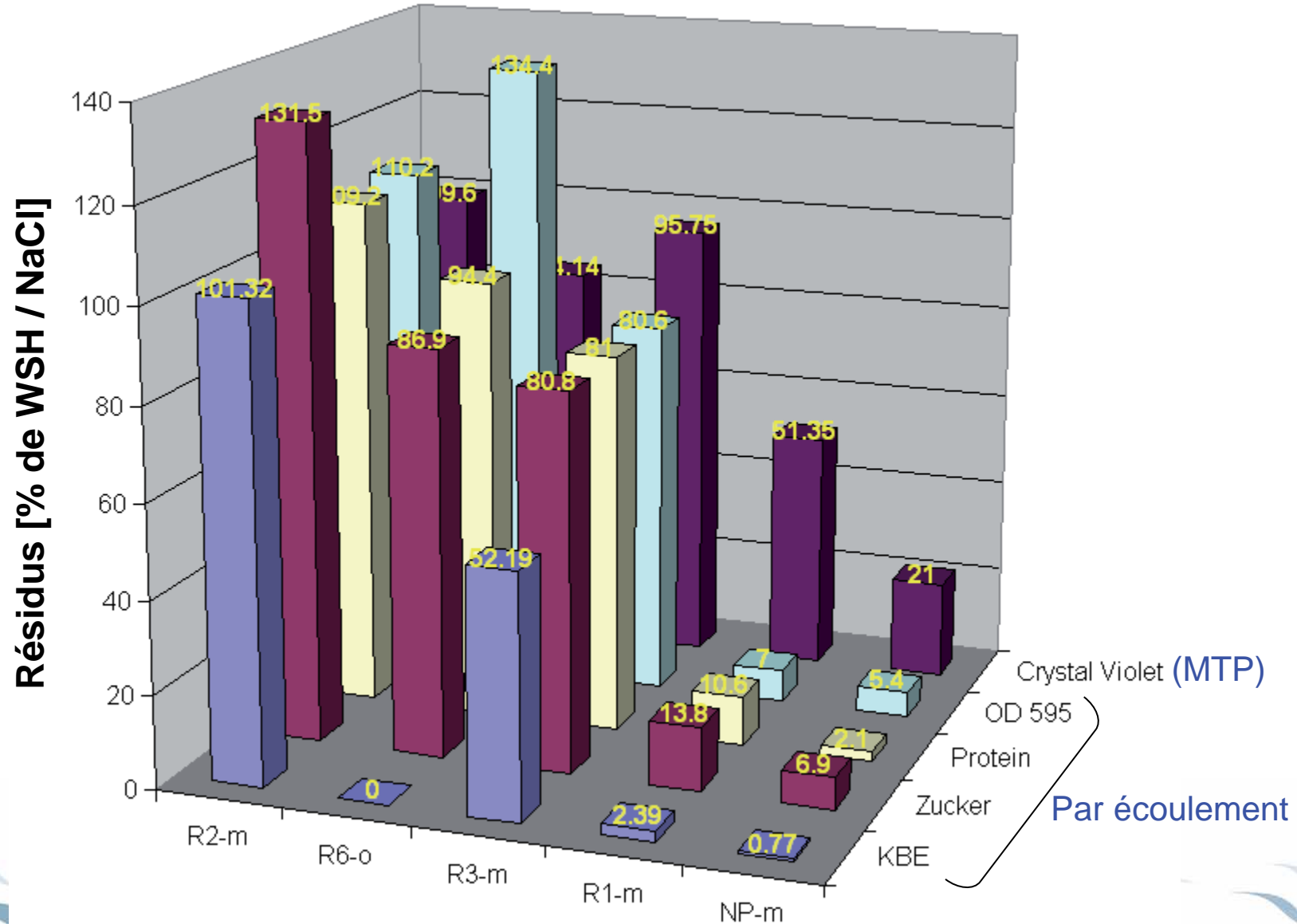
NP-m remplit  
exigences de l'ISO/TS  
15883-5:2005 Annexe  
F

# Nettoyage par écoulement 15 min



# Comparaison avec coloration CV

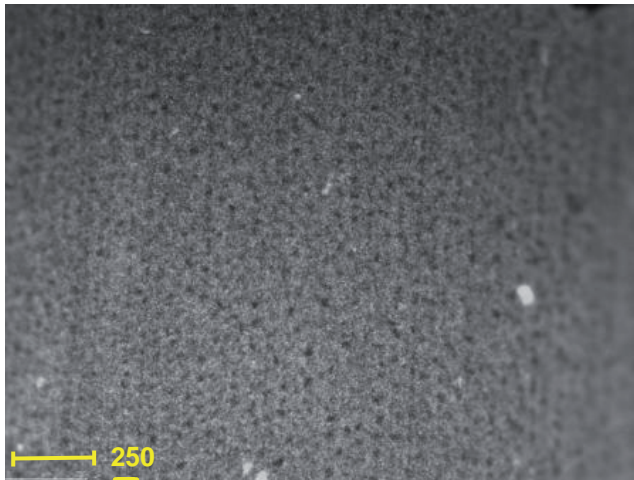
Coloration CV sur plaques de microtitrage (statique)



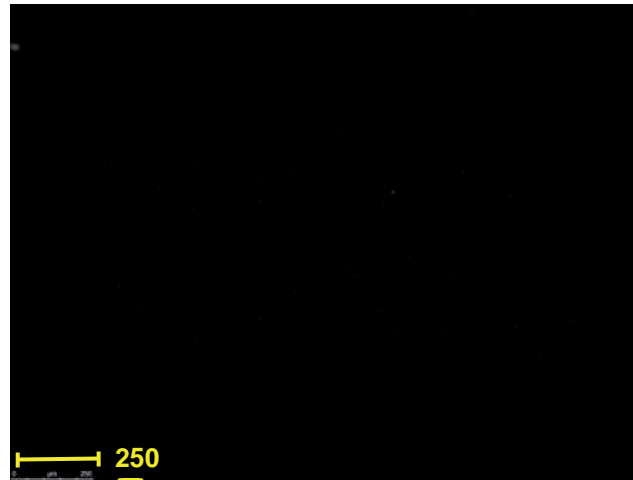
# Biofilm résiduel au microscope 4x

Coloration CYTO 9 (acides nucléiques)

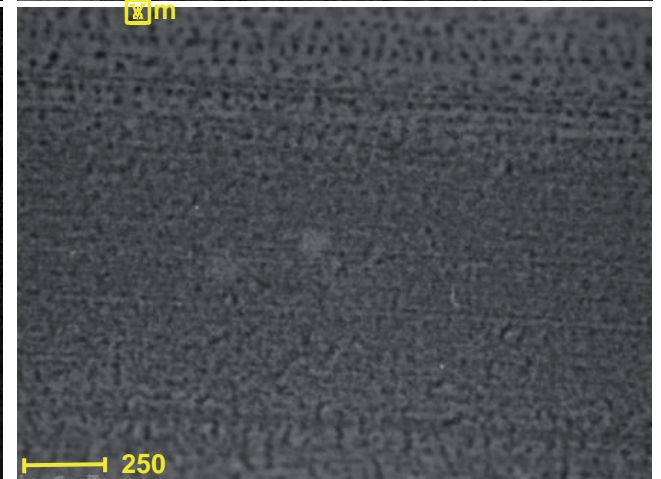
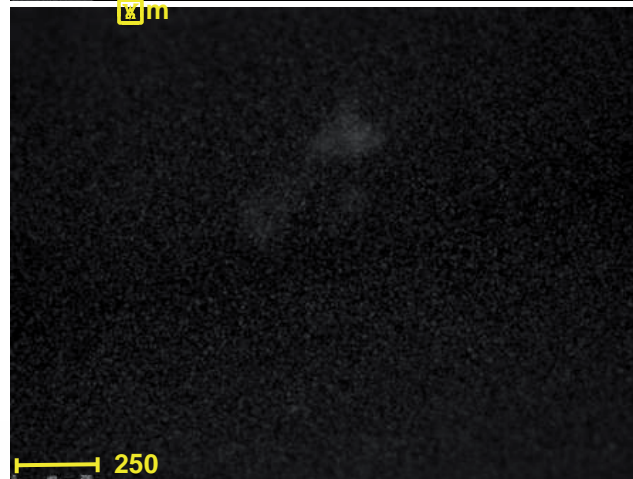
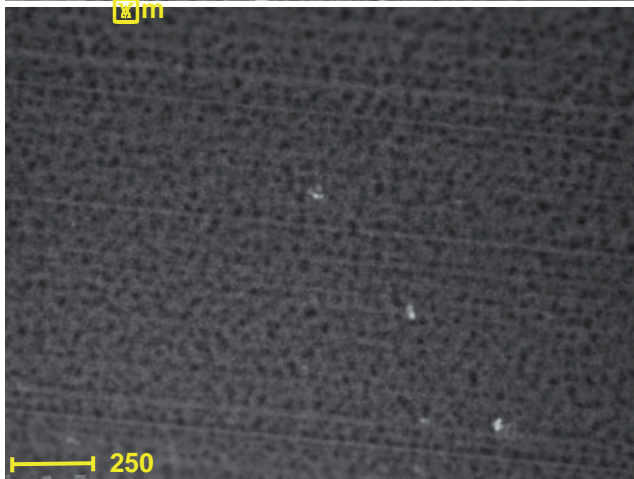
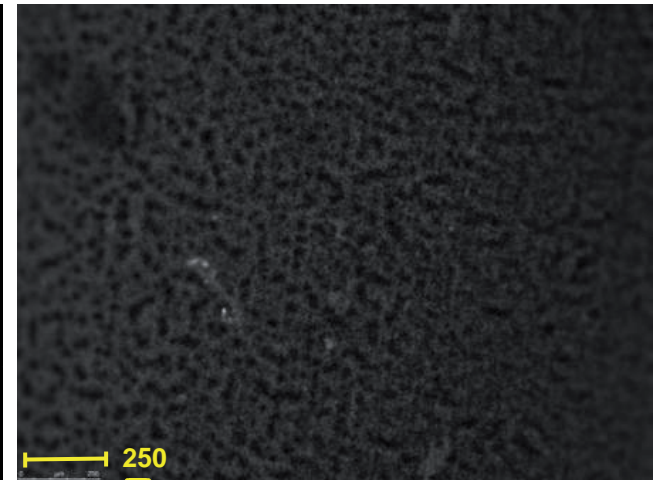
WSH



NP-m



R2-m



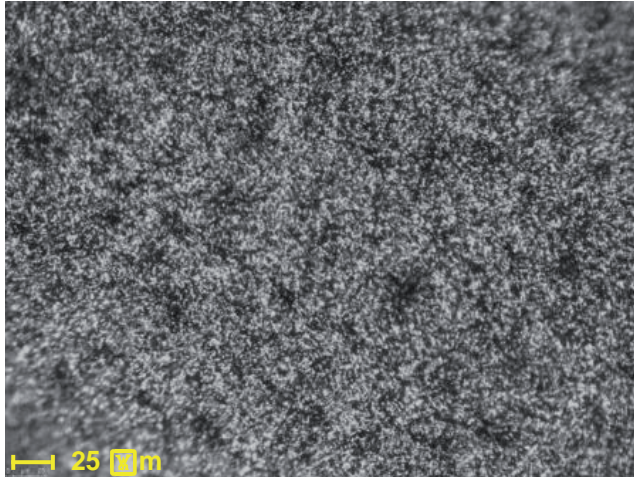
R3-m

R1-m

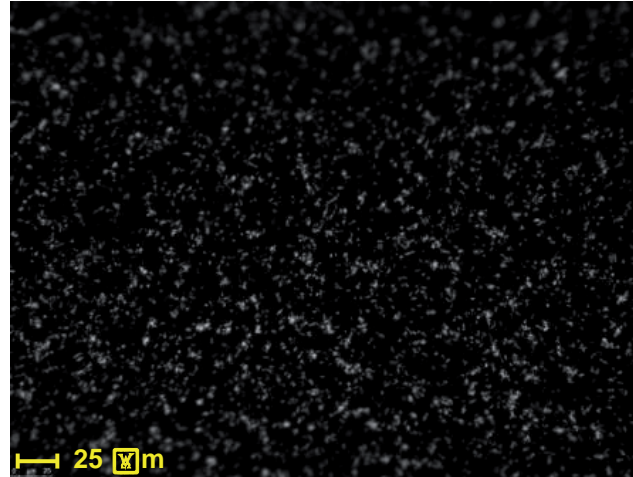
R6-o

# Biofilm résiduel au microscope 20x

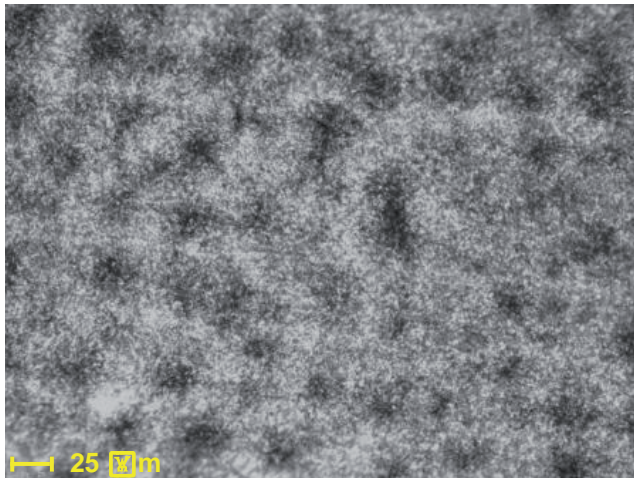
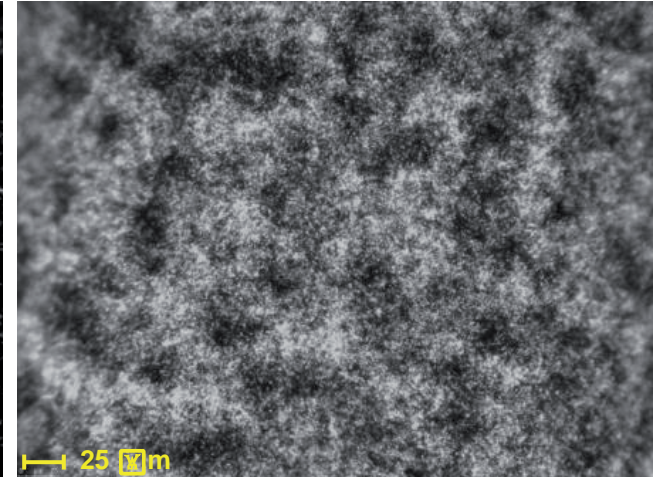
WSH



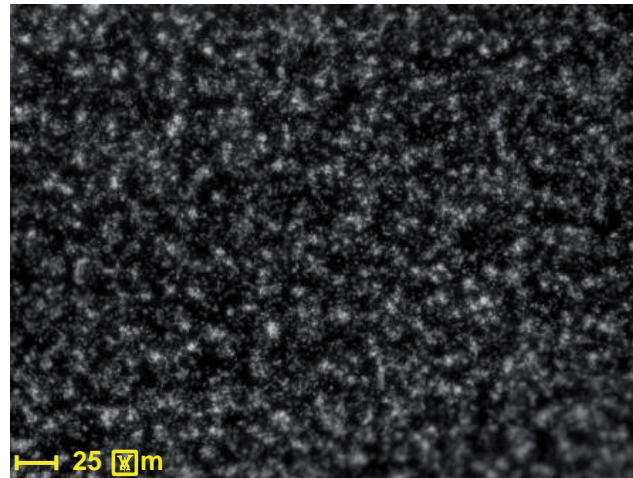
NP-m



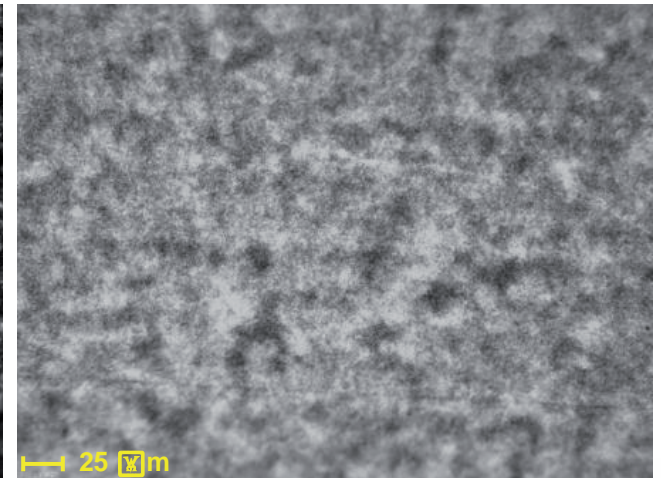
R2-m



R3-m



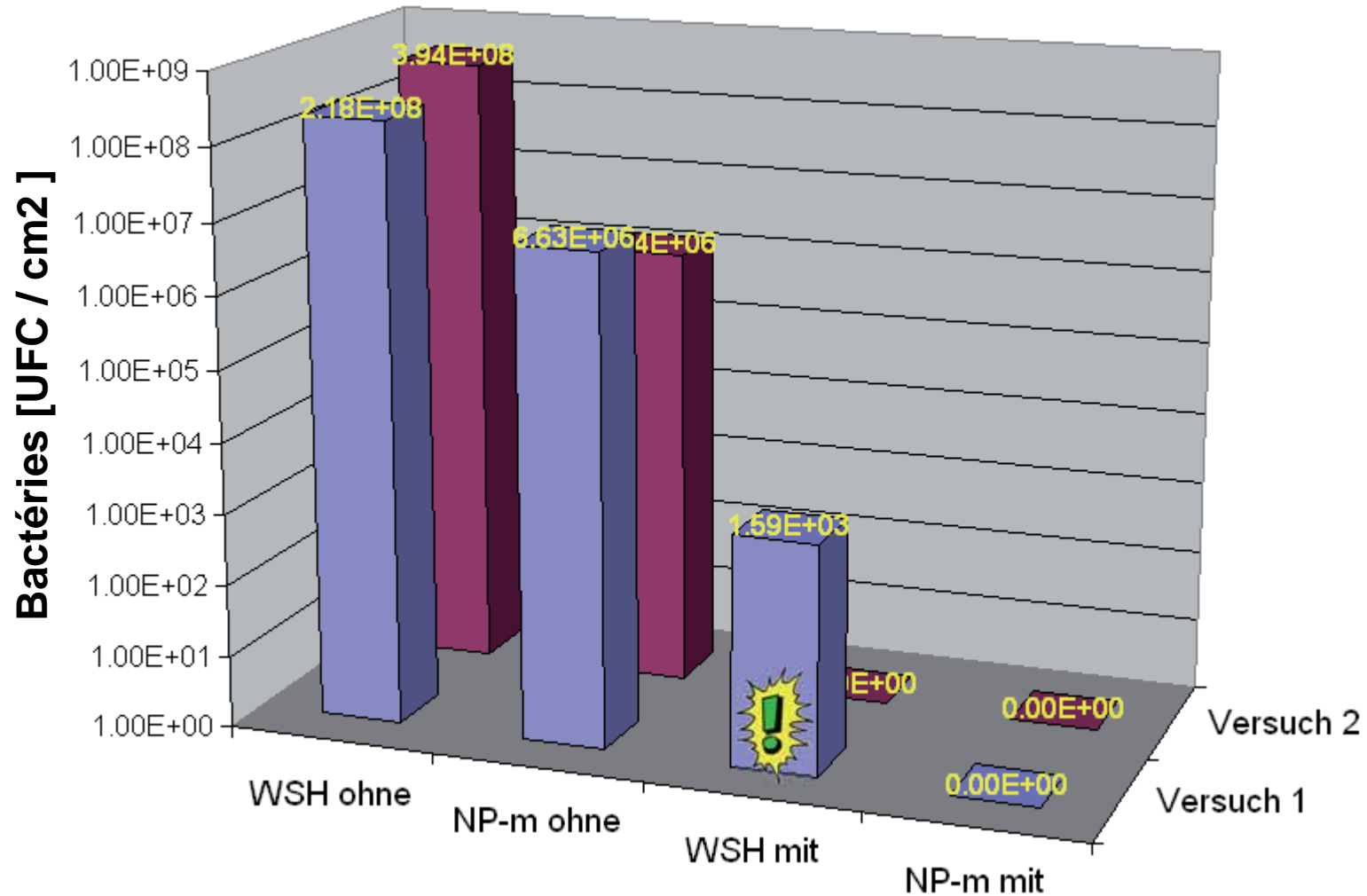
R1-m



R6-o

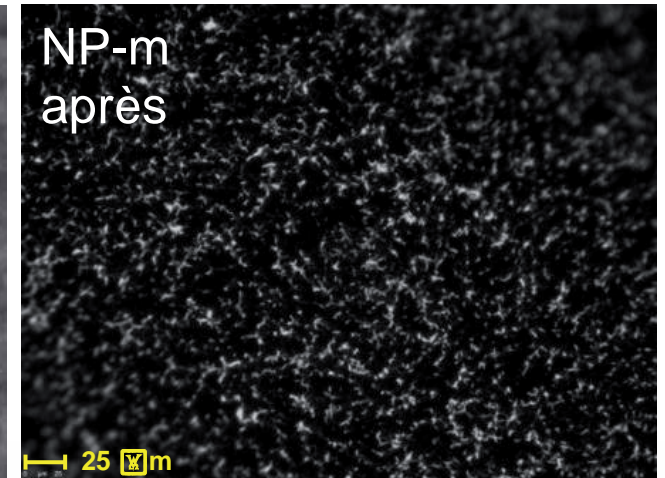
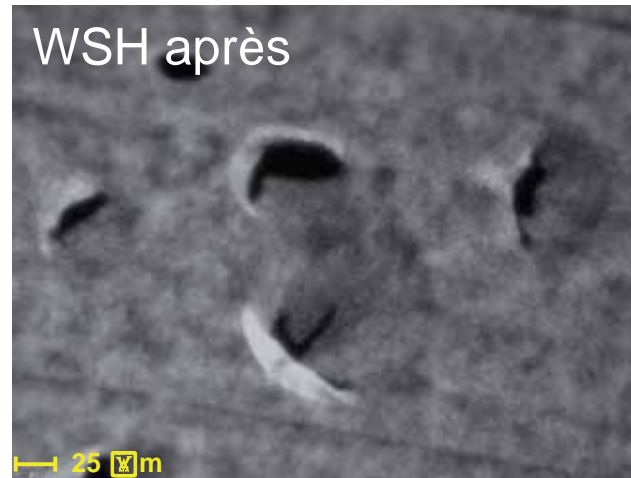
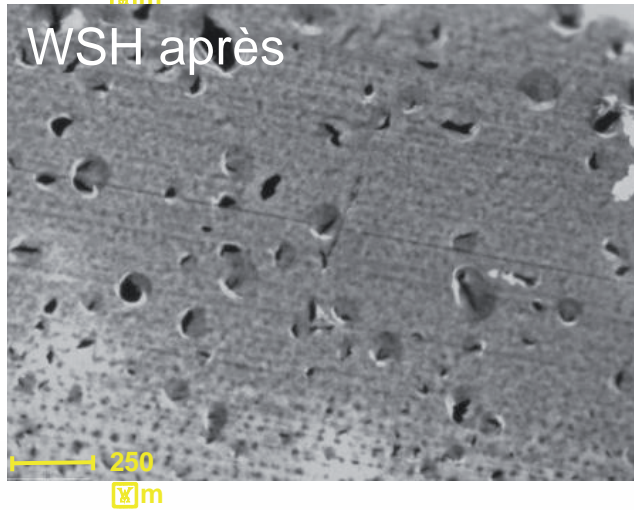
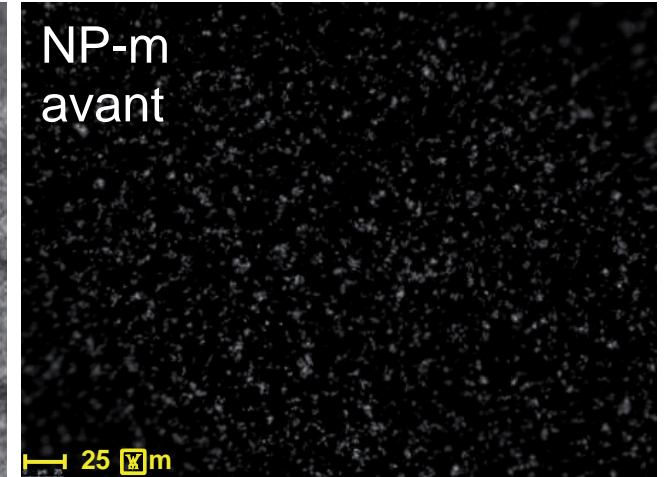
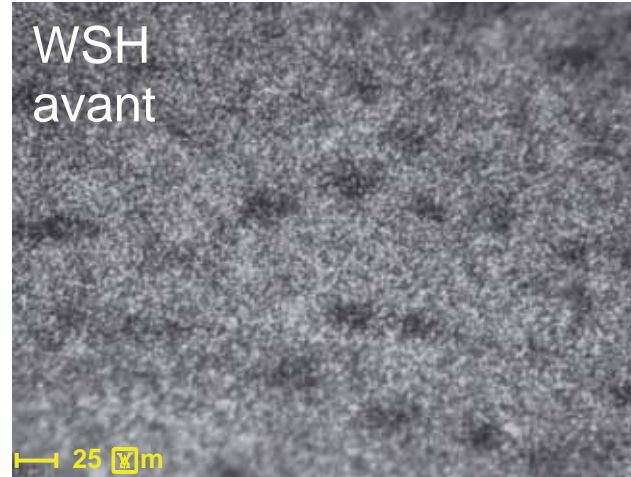
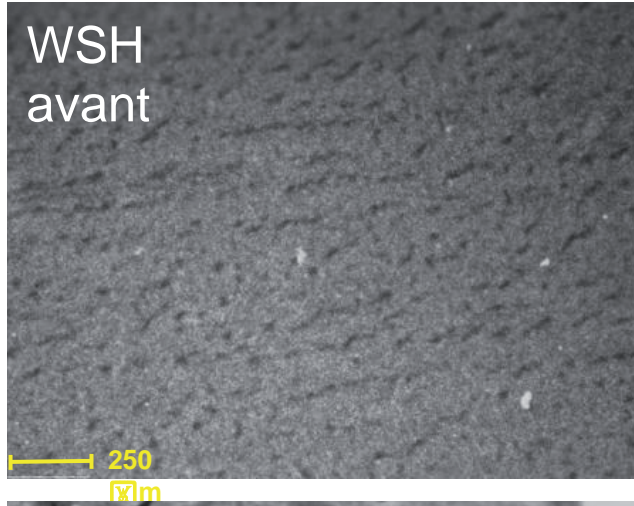
# Avec vs sans désinfection

Nettoyage 15 min, 200 mL/min → Désinfection 15 min, 4 mL/min



# Avec / sans désinfection

Désinfectant: deconex<sup>®</sup> HLD PA (acide peracétique)

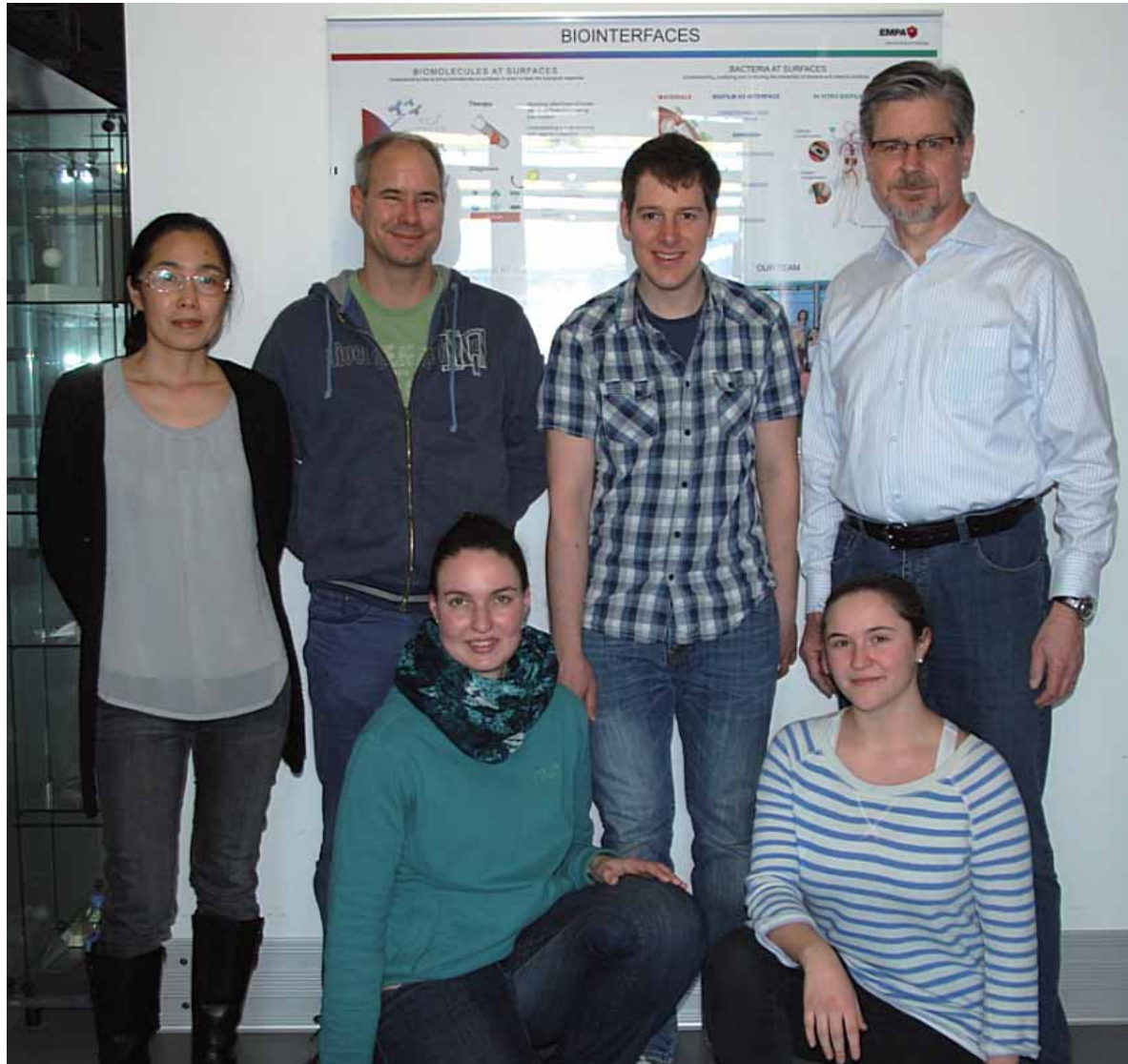




# Synthèse

- Diverses méthodes de mise en évidence sont nécessaires pour les différents stades de développement du produit.
- Les résultats des méthodes de screening MT sont pour l'essentiel congruents avec ceux des tests, plus complexes, effectués avec des dispositifs de substitution.
- Le biofilm *S. aureus* est moins résistant que le *P. aeruginosa*, en particulier aux détergents enzymatiques.
- D'une manière générale, les détergents désinfectants / contenant des substances actives désinfectantes ne fournissent pas de bons résultats de nettoyage, ni sur les biofilms, ni sur le sang. Les résultats sont particulièrement mauvais avec le biofilm *S. aureus*.
- Seul un bon nettoyage permet de garantir une désinfection subséquente conforme. En particulier dans le cas des biofilms.
- Dans le cadre du projet, un produit de (pré)nettoyage manuel a été développé, qui offre de bonnes propriétés nettoyantes contre les biofilms et le sang.

# Merci de votre intérêt!



## L'équipe

Dr. Qun Ren, Empa

Stefan Mauerhofer, Borer

Dr. Philipp Stiefel, Empa

Dr. Urs Rosenberg, Borer

Stefanie Altenried, Empa

Jana Schneider, Empa

