

Me protéinico

Mesure des résidus protéiniques sur les instruments : une tentative d'explication

Alain Carballo, Hôpital de l'Île, Berne

Sur l'initiative de mes supérieurs, j'ai cherché à examiner de plus près les différentes méthodes de mesure des résidus de protéines. Dans un premier temps, je me suis dit qu'il n'y avait pas de quoi fouetter un chat. Mais à peine avais-je démarré, que d'innombrables questions ont commencé à se poser ; et la réponse à une question soulevait aussitôt la question suivante.

POURQUOI LA MESURE DES RÉSIDUS PROTÉINIQUES A-T-ELLE, AU FIL DU TEMPS, GAGNÉ EN IMPORTANCE ?

Les formations continues et séminaires abordent toujours plus fréquemment cet aspect. Dans notre Stérilisation centrale, nous mesurons régulièrement les résidus de protéines sur les instruments et nous nous interrogeons sur les tolérances limites fixées par les tests. Aux dires des experts, ces tolérances – fixées aujourd'hui à 100 µg¹ par instrument – devraient à l'avenir être sensiblement revues à la baisse.

En 1995, le monde entier braqua les yeux sur la Grande-Bretagne : la maladie de la vache folle avait fait des morts dans de nombreux pays, mais c'est au Royaume-Uni que l'on enregistra le plus de décès. La menace représentée par la viande de bœuf contaminée par l'ESB atteint son paroxysme à la fin des années 1980 et au début des années 1990, à la suite de quoi les pays concernés imposèrent des mesures draconiennes à l'élevage bovin. Dont notamment le test de dépistage de l'ESB pour les bœufs destinés à l'abattage. La Commission européenne prit en charge la moitié des quelque 20 euros que coûtait ce test.

La maladie de Creutzfeldt-Jakob peut se déclarer des décennies après l'infection. A ce jour, les autorités britanniques ont recensé 177 cas de maladie

ayant eu une issue fatale, alors que ce sont probablement des millions de personnes qui ont été exposées au risque de contamination par l'agent ESB. Hors de Grande-Bretagne, la maladie a, selon les derniers chiffres, fait 51 victimes.

La variante moderne de la maladie de Creutzfeldt-Jakob est davantage répandue en Grande-Bretagne que ce que l'on pensait jusqu'à présent : une étude londonienne, publiée en 2013 dans le *British Medical Journal*, indique que 1 Britannique sur 2000 est porteur de l'« agent », même s'ils ne sont que très peu nombreux à développer la maladie. Telle est la conclusion, extrapolée, de l'équipe de chercheurs qui a analysé des échantillons tissulaires prélevés lors de plus de 32'000 appendicectomies réalisées dans 41 établissements hospitaliers. Jusqu'alors, les experts tablaient sur un ratio de 1 sur 4000. Les auteurs de l'étude soulignent qu'il faut impérativement veiller à ne pas augmenter le nombre de cas de Creutzfeldt-Jakob par voie de transfusions sanguines ou par manque de vigilance lors des interventions.

Il est à ce jour quasiment établi que la variante de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (vMCJ) est due à la consommation de viande bovine contaminée par l'ESB (encéphalopathie spongiforme bovine). La maladie dite de « la vache folle » est causée par des prions, c'est-à-dire des molécules protéiques atypiques mal pliées. Ces agents mortels détruisent le cerveau, qui se transforme en une masse spongieuse. Ils attaquent l'être humain également, qui présente alors des symptômes proches de ceux observés chez les bovins contaminés.

C'est dans ce triste contexte qu'est né le besoin de déterminer les résidus protéiniques. En Grande-Bretagne, les valeurs de tolérance sont en principe (selon les instruments) fixées à 1 µg par instrument.

COMMENT MESURER ?

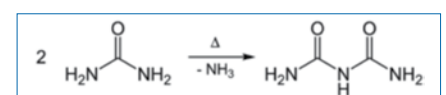
Diverses méthodes permettent de mettre en évidence les résidus de protéines. En laboratoire, tout est mesurable. Mais les Stérilisations centrales, elles, doivent se rabattre sur quelques produits disponibles sur le marché. Ces méthodes de mesure fonctionnent toutes selon le phénomène de réaction

biochimique et se distinguent par leurs résultats. Il existe des tests quantitatifs, semi-quantitatifs, qualitatifs ou semi-qualitatifs, en fonction du réactif utilisé et de divers paramètres (température, durée, pH du détergent), ou encore d'autres facteurs influant sur le résultat et pouvant le fausser. Les tests et réactifs les plus fréquemment utilisés sont le Biuret, le BCA (acide bicinchoninique), la ninhydrine et la méthode OPA (= méthode modifiée à l'orthophthalaldéhyde). Tout ça, c'est du déjà vu, pour autant que l'on connaisse la norme SN EN ISO 15883. Mes recherches n'ont pas inclus la méthode OPA, celle-ci n'entrant pas en ligne de compte dans une Stérilisation centrale. Il s'agit en effet d'une méthode très complexe, réalisée en laboratoire. Quant à la question de savoir à partir de quel moment une mesure est quantitative ou semi-quantitative, je n'ai pas creusé cet aspect. En Stérilisation centrale en effet, il nous faut simplement savoir si la méthode est quantitative, semi-quantitative ou si elle indique simplement oui / non.

BIURET ET BCA

Le terme Biuret provient du composé chimique carbamoyluré. « Bi » veut dire deux, et « Uret » vient d'« urea », la désignation latine de l'urée. Le biuret est un composé organique naturel, obtenu, lorsque l'urée est chauffée, par condensation de deux molécules d'urée et élimination d'une molécule d'ammoniac. Dans une solution alcaline contenant des ions de cuivre, le biuret réagit en formant un complexe violet.

Toutefois, cette méthode ne permet pas de déterminer les protéines, puisqu'elle ne fournit pas de colorations dont les nuances seraient visibles à l'œil nu. La coloration met en évidence la molécule de biuret. La réaction de Biuret réalisée avec des protéines fournit une coloration semblable. Cette réaction naturelle en solution aqueuse permet de mettre en évidence des protéines. Ainsi, en diagnostique clinique, la méthode de Biuret selon Weichselbaum permet de déterminer les protéines totales dans les liquides biologiques (transsudats et exsudats). En l'occurrence ce n'est pas le biuret qui est mis en évidence, celui-ci étant remplacé par des peptides², qui lient les ions de cuivre.



¹ NDLR : Directive de la DGKH, de la DGSV et de l'AKI relative à la validation et au contrôle systématique des processus de lavage et de désinfection en LD.

² Peptides : composés organiques qui se distinguent des protéines avant tout par leur masse molaire. On peut les considérer comme de petites protéines.

Cette réaction porte le nom de Biuret simplement parce que les liaisons et les ions de cuivre ressemblent à ceux obtenus lors de la formation du biuret, et parce que la coloration de la réaction est semblable (bien que le réactif ne soit en l'occurrence pas la molécule de biuret).

En modifiant cette méthode de Biuret pour en faire la méthode dite BCA, le test devient nettement plus sensible et permet alors de mesurer les quantités de protéines dans le domaine du microgramme. La désignation BCA s'explique par le nom du composé chimique, l'acide bicinchoninique. Mis en présence d'ions de cuivre et de peptides, cet acide forme un composé complexe d'un intense pourpre.

Ici, la force de la réaction est proportionnelle au nombre de peptides, ce qui explique la sensibilité et la précision élevées de ce test. La réaction BCA est même utilisée en biochimie pour déterminer quantitativement les protéines par photométrie.

NINHYDRINE

La ninhydrine sert de réactif pour mettre en évidence l'ammoniac et les acides aminés³. Non seulement méthode de détection et de détermination des acides aminés, la ninhydrine constitue aussi la méthode de détection des protéines la plus connue et la plus utilisée. Par scission et modification moléculaire, elle fournit une intense coloration violette, proportionnelle à la concentration en acides aminés. C'est ainsi qu'il est possible d'obtenir une mesure semi-quantitative des protéines.

La ninhydrine est également fréquemment utilisée comme réactif en spray, par exemple pour la chromatographie sur papier ou la chromatographie sur couche mince. Une autre application en est la visualisation des empreintes digitales: la sueur contient en effet des acides aminés, qui réagissent avec la ninhydrine et rendent ainsi les empreintes visibles.

La norme SN EN ISO 15883 décrit une méthode à la ninhydrine qui ne fournit qu'une indication positive / négative. Mes recherches me permettent toutefois de conclure que l'essai à la ninhydrine constitue une excellente méthode pour la pratique quotidienne, notamment parce qu'elle fournit des mesures semi-quantitatives dont la sensibilité est élevée (c.-à-d. que seules de faibles quantités sont nécessaires).

A la Stérilisation centrale de l'Hôpital de l'île, nous utilisons un test 3M simple, fondé sur la méthode BCA, et baptisé « Clean-Trace Surface Protein-High

Sensi ». Les résultats du test sont fonction de la durée et de la température: en modifiant ces paramètres, on obtient des valeurs limites différentes. Il est accompagné d'un tableau, qui recommande les valeurs limites selon la SN EN ISO 15883 et la Directive britannique HTM 2030⁴.

MON MESSAGE PERSONNEL

En cas de doute, ou par simple curiosité personnelle, un collaborateur devrait toujours avoir le courage et la possibilité de poser des questions. Les questions ne sont-elles pas les prémices de la sagesse ?

Lorsque j'ai interrogé des personnes dans le cadre de mon travail, j'ai obtenu différents types de réponses:

- Mais pourquoi serais-je censé savoir quoi de ce soit sur ce sujet ? De toute façon, je ne suis pas responsable de ces tests.
- Pourquoi est-ce important ?
- Avons-nous réellement besoin d'un test de mise en évidence des protéines ? Le contrôle visuel ne suffit pas ? De toute façon, le cycle de stérilisation tuera tous les micro-organismes !

Etre professionnel, c'est une question de volonté, d'intérêt et d'engagement, pas vraiment de revenu ! Un retraitement correct et responsable des DMx est une prestation qui est appréciée, par les chirurgiens, le personnel ou encore – et surtout – par les patients.

Pour élargir ses connaissances, il faut discuter, échanger ses points de vue, donner et recevoir des critiques, se montrer patient et disposé à aider, bien collaborer.

Lors du dernier congrès de la SSSH à Regensdorf, il avait été question de tolérances limites pour les résidus protéiniques sur les instruments. Ces limites doivent être abaissées, les conditions seront donc plus strictes. Ce qui atteste bien toute l'importance de ce sujet. Les résidus sanguins et tissulaires se composent de protéines. Les micro-organismes se composent de protéines (ainsi que d'acides aminés et de peptides). Or c'est précisément ce « truc » que nous devons nettoyer. On ne peut par conséquent pas même envisager de peut-être éventuellement s'interroger sur l'importance de ce sujet. Il n'est pas facultatif... il est IMPERATIF !

Dans le cours niveau I, j'ai appris que les germes morts et les protéines dénaturées pouvaient libérer des toxines, appelées pyrogènes, qui peuvent déclencher des réactions allergiques et des infections.

Conclusion: si nous n'assurons pas un nettoyage adéquat, parce que nous estimons que le cycle de stérilisation réglera de toute manière tous les problèmes, c'est que nous n'avons rien compris ! Et la saleté stérile, ça n'existe pas !

Je suis très heureux d'avoir eu la possibilité d'apprendre autant de choses au cours de ma recherche. |

³ Acides aminés: composés organiques qui désignent en général les acides aminés propres aux protéines (protéogènes). Il existe cependant aussi des acides aminés de synthèse ainsi que des acides qui ne font pas partie des protéines.

⁴ HTM 2030: Directive britannique sur le nettoyage / la désinfection des instruments chirurgicaux.

-ebro®

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



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

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

Druck- & Temperatur-Datenlogger (auch Funk)



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

- Kontrolle von Steckbecken, RDA's (auch Spüldruck) und Dampfsteril (Druck und Temperatur)
- robust und präzise
- einfache Handhabung
- leichtverständliche Software
- automatische Berechnung A₀-Werte

ebro Electronic GmbH

Dorfstrasse 26d / 8902 Urdorf

Tel. 044 777 17 63 / Fax 64

Email: info@ebro-ch.ch

Web: www.ebro-ch.ch