

Publication originale (en allemand) dans Zentralsterilisation: Zentr Steril 2004; 12 (1): 171-180
Reproduction avec l'aimable autorisation de la maison d'édition mhp Verlag, Wiesbaden

Nettoyage des instruments chirurgicaux réutilisables:

contrôle des résultats avec Pro-tect®

par R. Fushimi*, R. Hanamura, M. Takashina, S. Noguchi, S. Nakata, M. Monden

* Centre chirurgical, Hôpital universitaire Osaka, 2-15 Yamadaoka, Suita, Osaka

Mots clés:

- Mesure des résultats de nettoyage
- Test de frottis
- Protéine
- Noir d'amide 10 B
- Réaction de Biuret

L'on trouve souvent du sang ou de petits bouts de tissus sur les instruments chirurgicaux utilisés. Or pour éviter les infections et pour éviter tout problème lors de l'utilisation de ces instruments, ces souillures doivent être éliminées par nettoyage. Dans le service de pré-désinfection et nettoyage d'une stérilisation centrale moderne, l'on a recours à des laveurs-désinfecteurs ainsi qu'à des nettoyeurs à ultrasons. Les résultats de nettoyage obtenus avec ces appareils sont testés par exemple visuellement (contrôle visuel de la présence ou non de souillures) ou au moyen de colorants réagissant aux protéines. Ces deux types de contrôle dépendent toutefois largement du jugement subjectif de la personne chargée des tests; de plus, dans le cas de la méthode de coloration, l'instrument doit faire l'objet d'un nouveau nettoyage, afin d'éliminer l'indicateur colorant. Il est en outre impossible de déterminer quantitativement les souillures résiduelles. Par conséquent, si l'on souhaite introduire des méthodes de nettoyage des instruments plus précises, ces limitations sont loin d'être satisfaisantes. Nous avons analysé le système Pro-tect, qui se compose d'un bâtonnet de ouate à frot-

ter l'instrument et d'un réactif permettant de mesurer la concentration des protéines. Au moyen de séries de dilution de protéines, nous avons déterminé la corrélation entre l'intervalle de réaction et l'intensité de la couleur de la réaction et nous avons comparé la sensibilité de la mesure Pro-tect avec celle de la méthode de coloration des protéines. Il en résulte que Pro-tect permet de prouver la présence de protéines même à une quantité aussi faible que 25 µg environ, le tout au moyen d'un test par frottis très simple sur l'instrument. Nous sommes donc d'avis que la mesure de la qualité du nettoyage des instruments au moyen de Pro-tect s'avère utile non seulement pour contrôler le processus de nettoyage, mais aussi pour évaluer les performances des détergents et des laveurs-désinfecteurs.

Introduction

L'on trouve souvent du sang ou de petits bouts de tissus sur les instruments chirurgicaux utilisés. Or pour éviter les infections et pour éviter tout problème lors de l'utilisation de ces instruments, ces souillures doivent être éliminées par nettoyage. Dans les services hospitaliers de nettoyage des instruments – p. ex. dans les stérilisations centrales –, l'on a recours à des détergents enzymatiques puissants utilisés dans les laveurs-désinfecteurs ainsi qu'à des nettoyeurs à ultrasons. Il est toutefois particulièrement difficile d'éliminer les souillures tenaces des instruments. Selon divers rap-

ports, des tests bactériologiques effectués sur 50 instruments (dont de grands crochets, des blue chips et des ciseaux Metzenbaum) nettoyés normalement après les interventions chirurgicales ont abouti aux résultats suivants: présence de micro-organismes dans une concentration de 100 ufc sur 14% des instruments, 11 à 100 ufc sur 14% supplémentaires et absence de tout micro-organisme dans 30% des cas seulement (1). Certes, un test microbiologique est un excellent moyen pour prouver la présence de souillures bactériennes sur des instruments nettoyés; il n'empêche que pour un collaborateur de la stérilisation centrale, ce type de test est relativement complexe à effectuer.

En d'autres termes: on a besoin d'un processus qui indique de manière simple, rapide et précise la quantité de souillures résiduelles sur les instruments après le traitement de ceux-ci. Actuellement, les résultats du nettoyage des instruments sont testés soit visuellement, soit au moyen de colorants réagissant aux protéines, soit au moyen d'un indicateur contenant de l'adénosine triphosphate (ATP; présent en grande quantité dans le sang). Les deux premiers types de contrôle dépendent toutefois largement du jugement subjectif de la personne chargée des tests; de plus, dans le cas de la méthode de coloration, l'instrument doit faire l'objet d'un nouveau nettoyage, afin d'éliminer le colorant. Enfin, il est impossible de déterminer quan-

titativement les souillures résiduelles. Quant à la mesure de la concentration d'ATP résiduel au moyen d'un indicateur, celle-ci est plus précise et fournit en outre des indications quantitatives. Par contre, elle nécessite l'utilisation d'un réactif ainsi que d'un appareil spécial de mesure de la luminescence; elle n'est par conséquent pas très répandue. Dans ce contexte, la nécessité apparaît clairement de disposer d'une méthode simple, permettant de mesurer quantitativement les résultats du nettoyage des instruments.

Nous avons donc analysé le système Pro-TECT – qui se compose d'un bâtonnet de ouate à frotter l'instrument et d'un réactif permettant de mesurer la concentration des protéines –, afin de déterminer si ce produit est capable de mesurer les résultats du nettoyage des instruments.

Nos tests ont montré que Pro-TECT permet de prouver la présence de protéines jusqu'à une quantité aussi faible que 25 µg environ, le tout au moyen d'un test de frottis très simple sur l'instrument. Ce résultat nous semble tout à fait remarquable et c'est la raison pour laquelle nous présentons ci-après un rapport portant sur l'efficacité de Pro-TECT; nous nous fondons sur des données de performances élémentaires, notamment sur les courbes standard obtenues sur la base de solutions protéiniques diluées ainsi que sur une comparaison de la sensibilité des mesures Pro-TECT et de la méthode de coloration des protéines.

Matériaux et méthodes

Kit de test de nettoyage par frottis

Le produit que nous avons testé s'appelle Pro-TECT® (Biotrace International plc. Bridgend, Grande-Bretagne); il s'agit d'un kit de test de nettoyage par frottis (fig. 1). Ce kit comprend un bâtonnet de ouate à frotter sur la surface de l'instrument ainsi qu'un petit tube synthétique contenant un réactif de Biuret (750 µl) (fig. 2, 3) servant à mesurer la concentration protéinique. Après avoir été passé sur l'instrument, le bâtonnet est introduit dans le tube synthétique par l'ouverture du haut. Ce faisant, le bâtonnet transperce une membrane protectrice à l'intérieur du tube et entre en réaction avec le réactif de Biuret, qui vire de couleur, en fonction de la quantité de protéines présentes.

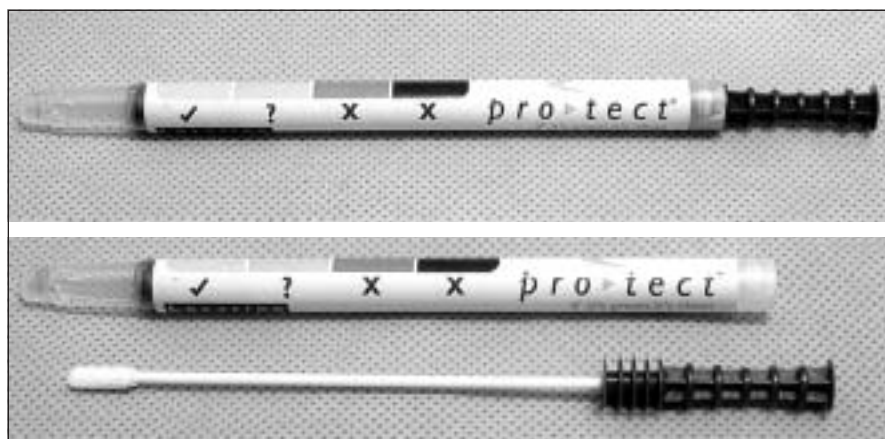


Fig. 1: Apparence du kit de test Pro-TECT® (Biotrace Co., Ltd.)

Processus de mesure pour déterminer les courbes d'absorption du réactif de Biuret Pro-TECT et de l'échantillon

Le réactif Pro-TECT de 5 kits a été pipeté et introduit dans une cuvette en verre de 1 x 1 cm. La plage de mesure d'un spectrophotomètre UV-lumière visible Shimadzu 1240 (Shimadzu Co., Ltd., Kyoto, Japon) a été réglée entre 400 et 700 nm, et la densité optique du réactif (contrôle) a été mesurée à des intervalles de 20 nm. Ensuite, 100 µl de plasma (obtenus par centrifugation de sang héparinisé à 3000/min pendant 5 minutes) ont été ajoutés au réactif puis, 30 minutes après le mélange, la densité optique de l'échantillon a été mesurée selon la même méthode que pour le réactif de contrôle.

Evolution dans le temps de la densité optique du réactif de Biuret Pro-TECT

Le réactif Pro-TECT de 5 kits a été pipeté et introduit dans une cuvette en verre de 1 x 1 cm. 20 µl de plasma (obtenus par centrifugation de sang héparinisé à 3000/min pendant 5 minutes) ont été ajoutés au réactif et introduit dans la cuvette (échantillon A); la densité optique de cet échantillon a ensuite été mesurée à 560 nm toutes les 10 minutes après le mélange, pendant 60 minutes. 20 µl de plasma, dilué quatre fois dans une solution saline physiologique, ont ensuite été introduits dans une autre cuvette, dans laquelle on a ajouté le réactif de 5 autres kits de test Pro-TECT (échantillon B). La densité optique a, dans ce cas également, été mesurée selon la même méthode.

Courbe standard Pro-TECT

Du Chem Trak Puratinum (Medical Analysis System, Inc., Californie, USA) a été dilué

dans une solution saline physiologique de sorte à obtenir une concentration protéinique totale respectivement de 5, 10, 25, 50, 100 et 300 µg/100 µl; chaque solution diluée a ensuite été absorbée par 5 bâtonnets Pro-TECT. Puis ceux-ci ont été introduits dans les petits tubes synthétiques prévus à cet effet, pour déclencher la réaction. Après 30 minutes, le réactif avec l'échantillon de chacun des 5 tubes de même concentration a été pipeté dans une cuvette et la densité optique de chaque échantillon a été mesurée à 560 nm.

Comparaison de la sensibilité de mesure entre la méthode de coloration des protéines et la méthode Pro-TECT

100 µl de Chem Trak Puratinum, dilué à des concentrations protéiniques de 5, 25, 50 et 100 µg/100 µl, ont été déposés sur 3 plaquettes en acier inoxydable (15 x 50 mm), qui ont séché pendant 3 heures à température ambiante. Chacune des plaquettes en acier inoxydable a ensuite été immergée pendant 5 minutes dans une solution de noir d'amide 10 B (fig. 4, 5) (Clean Chemical Co., Ltd., Osaka, Japon), un colorant qui se fixe aux protéines, puis rincée pendant 1 minute sous l'eau courante avant d'être remise à sécher à température ambiante. 100 µl de solutions protéiniques concentrées à 5, 25, 50 et 100 µg/100 µl ont été pipetés sur 5 bâtonnets Pro-TECT. Une fois les solutions absorbées, les bâtonnets ont été introduits dans les petits tubes synthétiques prévus à cet effet, pour déclencher la réaction. Après 30 minutes, le réactif avec l'échantillon de chacun des 5 tubes de même concentration a été pipeté dans une cuvette et la densité optique de chaque échantillon a été mesurée à 560 nm.

Méthode de coloration des protéines, méthode Pro-TECT et mesure de concentration d'ATP avec, comme échantillon, du sang déposé sur des plaquettes en acier inoxydable

Du sang complet héparinisé a été dilué respectivement 10, 40, 100 et 400 fois dans une solution saline physiologique. 20 µl de chaque dilution ainsi que 20 µl de sang complet ont été appliqués sur 3 plaquettes en acier inoxydable (15 x 50 mm). Pour chaque dilution, une première plaquette a été mise à sécher pendant 3 heures à température ambiante, puis immergée pendant 5 minutes dans du noir d'amide 10 B, puis rincée pendant 1 minutes sous l'eau courante. Une deuxième plaquette a été frottée avec un bâtonnet Pro-TECT, qui a ensuite été introduit dans le petit tube synthétique prévu à cet effet, pour déclencher la réaction. La dernière des plaquettes a été frottée avec un bâtonnet de ouate afin de mesurer la concentration d'ATP; l'ATP sur le bâtonnet a été extrait dans 1 ml d'eau déminéralisée. La concentration d'ATP dans la solution ainsi obtenue a été mesurée selon le processus de la bioluminescence (fig. 6, 7). Le réactif et l'appareil de mesure de la concentration d'ATP provenaient tous deux de Nissui Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo, Japon.

Résultats

La figure 2 montre la courbe d'absorption pour le réactif de Biuret Pro-TECT et pour l'échantillon. Dans la fourchette comprise entre 500 nm et 700 nm, la densité optique du contrôle du réactif de Biuret était quasi nulle, celle de l'échantillon en revanche était de 3194 à 520 nm, de 2475 à 560 nm et de 2479 à 580 nm. Etant donné que la densité optique a à peine oscillé à une longueur d'onde de 560 nm, nous avons décidé de prendre 560 nm comme valeur de référence pour la mesure de la densité optique de nos expériences.

La figure 3 montre l'augmentation de la densité optique, au fil du temps, du réactif de Biuret Pro-TECT après la réaction. 30 minutes après le début de la réaction, l'échantillon A faisait état d'une absorption de 0,946; 60 minutes après le début de la réaction, l'absorption était de 1,212; 30 minutes après le début de la réaction, l'échantillon B indiquait une absorption de 0,438; 60 minutes après le début de la réaction, l'absorption était de 0,575. Sur la base de ces résultats,

Fig. 2: Courbes d'absorption pour le réactif de Biuret Pro-TECT® et pour l'échantillon.

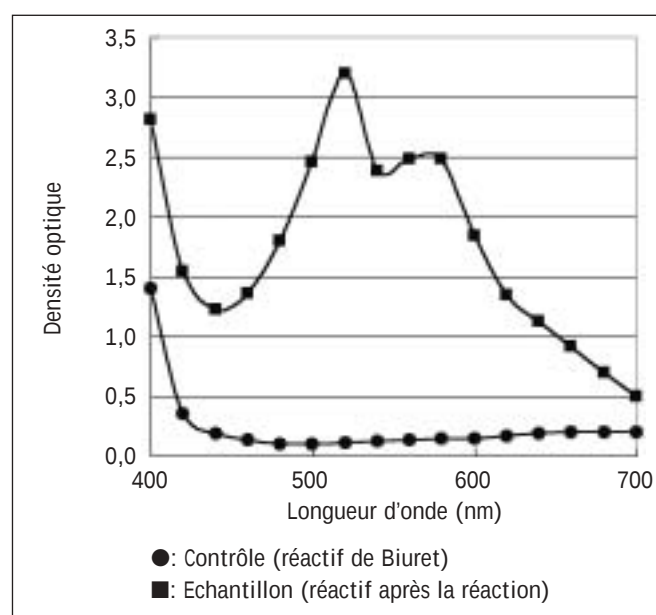


Fig. 3: Evolution temporelle de la réaction avec le réactif de Biuret Pro-TECT®.

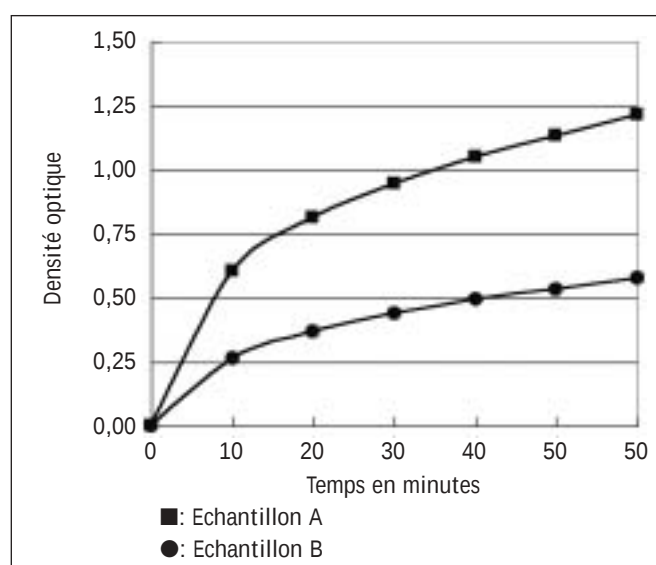
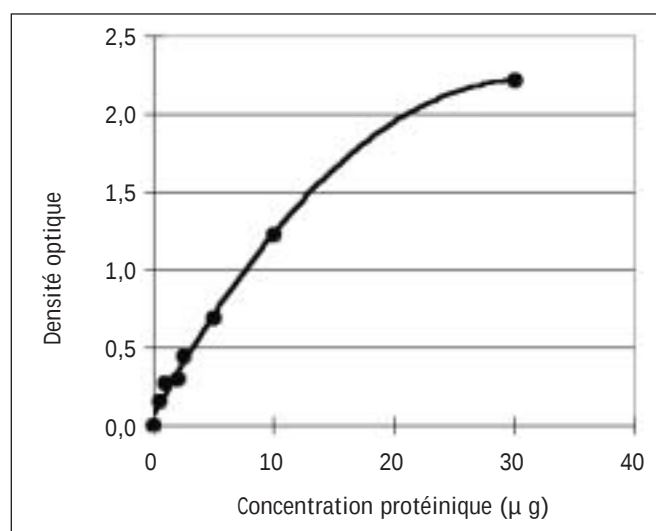


Fig. 4: Courbe standard Pro-TECT®.



nous avons décidé, pour déterminer la concentration protéinique avec Pro-tect, de mesurer la densité optique 30 minutes à compter du moment où le bâtonnet avait été introduit dans le tube.

Figure 4: courbe standard pour le réactif Pro-tect, après la réaction avec les bâtonnets imbibés des solutions de 5, 10, 25, 50, 100 et 300 µg de protéines par 100 µl. La courbe standard avait la forme d'un bol à l'envers. L'absorption était de 0,274 pour 10

µg de protéines, de 0,690 pour 50 µg de protéines, de 1,230 pour 100 µg de protéines. La figure 5 présente les résultats de la coloration au noir d'amide 10 B de plaquettes en acier inoxydable sur lesquelles avaient été déposés 100 µl d'une solution concentrée à 5, 25, 50 et 100 µg de protéines par 100 µl. Si nous n'avons pas pu constater de nette coloration bleue pour la plaquette avec 5 µg de protéines, la coloration était

par contre marquée à partir de 25 µg de protéines et plus. La figure 6 montre le résultat 30 minutes après avoir frotté les solutions de même concentration avec les bâtonnets et après la réaction avec le réactif Pro-tect. La densité optique du réactif après la réaction était de 0,154 pour 5 µg de protéines, de 0,452 pour 25 µg de protéines et de 0,630 pour 50 µg de protéines. La figure 7 montre ces mêmes échantillons après avoir déposé 20 µl de sang sur les

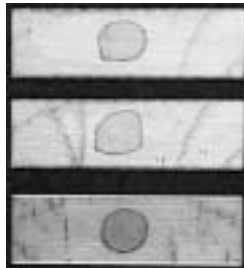
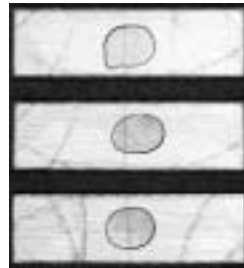
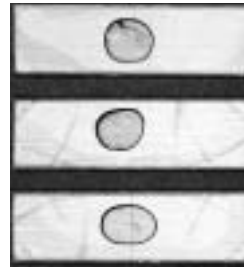
Concentration protéinique (µg)				
Contrôle (0)	5	25	50	100
				

Fig. 5: Sensibilité de mise en évidence de la méthode de coloration fixant les protéines.

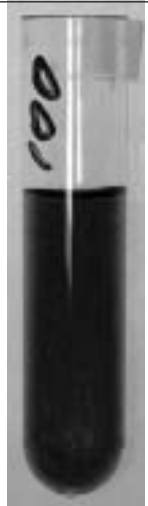
Concentration protéinique (µg)	Contrôle (0)	5	25	50	100
Réactif après la réaction (des 5 sets)					
Densité optique (de 5 6 0 nm)		0.154	0.452	0.630	1.230
Réaction					

Fig. 6: Sensibilité de mise en évidence de la méthode Pro-tect®.

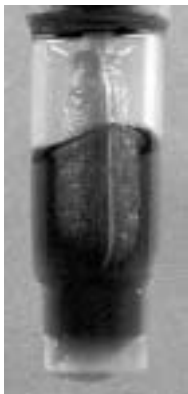
Dilution		Aucune	10 ×	40 ×	100 ×	400 ×
Méthode						
Méthode de coloration fixant les protéines						
Concentration d'ATP (mol/ml)		8080×10^{-11}	369×10^{-11}	24.5×10^{-11}	8.33×10^{-11}	2.21×10^{-11}
Méthode Pro-TECT®	Réactif après la réaction					
	Concentration protéinique (µg)	100 ou plus	50 ~ 100	25 ~ 50	5 ~ 25	0 ~ 5

Fig. 7: Résultats des mesures effectuées avec la méthode de coloration fixant les protéines, avec la méthode Pro-TECT® et avec la mesure de la concentration de l'adénosine triphosphate (ATP) avec du sang sur des plaquettes en acier inoxydable.

plaquettes en acier inoxydable, leur apparence après coloration au noir d'amide 10 B, les concentrations d'ATP des bâtonnets qui avaient été passés sur les plaquettes en acier, des photos du réactif Pro-TECT après la réaction ainsi que les concentrations protéiniques déterminées sur la base des résultats de la figure 6. Lors d'une dilution de 400 fois du sang, la coloration bleue était à peine discernable, mais dès une dilution de 100, une légère coloration bleue était visible. A l'inverse, avec Pro-TECT, nous avons pu constater à l'œil nu que pour le sang dilué d'un facteur de 10, la quantité de protéines devait se situer entre 50 et 100 µg et que pour le sang dilué 100 fois, elle devait être comprise entre 5 et 25 µg. Les mesures de concentration d'ATP ont, quant à elles, permis d'enregistrer des valeurs quantitatives ($2,21 \times 10^{-11}$ mol/ml), même pour le sang dilué 400 fois.

Discussion

Si l'on veut garantir une stérilisation irréprochable, il est indispensable de nettoyer au préalable les instruments chirurgicaux, afin de les débarrasser de souillures résiduelles tenaces telles que le sang. Or pour contrôler

les résultats de ce nettoyage, l'on doit pouvoir déterminer la quantité de protéines et d'autres souillures résiduelles sur les instruments nettoyés. Toutefois, les méthodes qui ont cours actuellement – comme l'inspection visuelle après le nettoyage pour voir s'il reste encore des substances sur les instruments ou le processus de coloration des protéines, qui implique également un contrôle visuel –, ces méthodes dépendent largement du jugement subjectif de la personne chargée du contrôle et elles ne permettent pas de fournir des données quantifiables.

Le produit Pro-TECT, dont le test fait l'objet du présent rapport, fonctionne de manière très simple. Il suffit en effet de frotter la surface de l'instrument à tester avec un bâtonnet de ouate et d'introduire ensuite celui-ci dans le petit tube en plastique livré à cet effet et contenant un réactif de Biuret. Les processus difficiles à mettre en œuvre ou exigeant des réactifs ou des appareils spéciaux ne réussiront pas à s'imposer dans les services de stérilisation centrale, déjà très sollicités. Dans cette optique, Pro-TECT peut être considéré comme un bon processus de mesure des résultats du nettoyage des instruments.

La sensibilité de mesure de Pro-TECT est relativement bonne. Comme le montre en effet l'illustration 6, la personne chargée du test peut, à l'œil nu, déterminer de manière fiable la présence de protéines dès 25 µg déjà. Certes, la méthode de coloration au noir d'amide 10 B permet également de détecter 25 µg de protéines, mais elle implique de renettoyer l'instrument testé afin d'éliminer la solution colorante.

Lorsque nous avons prélevé au moyen des bâtonnets Pro-TECT le sang dilué sur les plaquettes en acier inoxydable et que nous avons effectué les mesures conformément aux photos, qui montrent les réactions par coloration pour 100 µl de solution respectivement à 5, 25, 50 et 100 µg de protéines (fig. 6), Pro-TECT nous a permis de déterminer des valeurs semi-quantitatives de protéines dans des fourchettes de 5–25 µg ou de 50–100 µg (fig. 7). Certes, le noir d'amide 10 B permet également d'obtenir des valeurs semi-quantitatives lorsque l'on procède à une élution de la coloration bleue dans une solution basique, mais l'obtention de l'élution exige beaucoup de temps et de travail, et la solution d'extraction risque, dans certains cas, d'endommager l'instrument. Par conséquent,

Pro-TECT est supérieur à la méthode de coloration au noir d'amide 10 B, de nos jours largement répandue pour tester les résultats des nettoyages. Il faut toutefois également reconnaître que les résultats obtenus avec Pro-TECT sont moins détaillés que ceux obtenus par la mesure de la concentration d'ATP. A noter qu'avec le réactif de Biuret du kit Pro-TECT, la réaction se poursuit dans le temps; ainsi, même 60 minutes après le début de la réaction, la densité optique n'est pas encore stabilisée (fig. 3). Ce phénomène s'explique probablement par les progrès effectués sur le réactif et grâce auxquels celui-ci réagit déjà en présence d'infimes quantités de protéines. Avec Pro-TECT, il est par conséquent nécessaire de déterminer la mesure à un instant précis après le début de la réaction. Pour notre part, nous pensons que cet instant peut être fixé à 30 minutes après le début de la réaction. De plus, étant donné que la quantité de protéines présentes sur le bâtonnet dépend de la taille de la surface sur laquelle on a frotté le bâtonnet, il faut également déterminer cette dernière. Nous pensons

qu'une surface de 1 x 1 cm sur l'instrument est suffisante, ce qui n'empêche toutefois pas de procéder à une mesure en frottant toute la surface de l'instrument. En outre, l'on peut tout à fait imaginer ne contrôler les résultats du nettoyage qu'à un endroit précis de l'instrument, p. ex. à l'articulation d'une pince, un endroit dont on sait qu'il est particulièrement difficile à nettoyer.

Puisqu'il permet d'effectuer, de manière simple et fiable, des mesures semi-quantitatives, Pro-TECT constitue donc un procédé privilégié pour évaluer les résultats du nettoyage d'instruments chirurgicaux et s'avère également très utile pour tous ceux qui recherchent des processus de nettoyage plus efficaces.

Références

1. Rutala WA, Gergen MF, Jones JF, et al: Levels of microbial contamination on surgical instruments. *Am J Infect Control* 1998; 26: 143–145.
2. Kingsley GR: The direct Biuret method for the determination of serum proteins

as applied to photoelectric and visual colorimetry. *J Lab Clin Med* 1942; 27: 840–845.

3. Gornall AG, Bardawill CJ, David MM: Determination of serum proteins by means of the Biuret reaction. *J Biol Chem* 1949; 177: 751–766.
4. Heinzel W, Vogt A, Kaller E, et al: A new method for the quantitative determination of antibody and antigen protein, with a sensitivity to five micrograms. *J Lab Clin Pathol* 1946; 66: 334–343.
5. Schaffner W, Weissmann C: A rapid, sensitive, and specific method for the determination of protein in dilute solution. *Anal Biochem* 1973; 56: 502–514.
- 6) Beutler E, Baluda M: Simplified determination of blood Adenosine Triphosphate using the Firefly system. *Blood* 1964; 23: 688–697.
- 7) Venkateswaran K, Hattori N, La Duc M.T., et al: ATP as a biomarker of viable microorganisms in clean-room facilities. *J of Microbiological Methods* 2003; 52: 367–377.

Technische STERILISATIONsassistentin/-assistent

- Fachkunde I:** 17. - 29. Jan. / 18. - 30. April 2005
(2 Kurse)
- Fachkunde II:** 13. - 25. September 2004
- Fachkunde III:** 08. - 19. Nov. 2004 u. 14. - 25. Febr. 2005

EO und FA - STERILISATOREN RAUMDESINFEKTION mit Formaldehyd

27. - 29. Sept. 2004 Vollkurs
27. - 28. Sept. 2004 Auffrischkurs

Effektive MITARBEITERFÜHRUNG

09. - 10. Dez. 2004 Seminar

KONFLIKT-MANAGEMENT

21. - 22. Okt. 2004 Seminar

Rhetorik und Präsentation - DIE FREIE REDE

07. - 08. Okt. 2004 Seminar

FÜHREN und MODERIEREN von Team- und Gruppenbesprechungen

09. - 10. Juni 2005 Seminar

Erfolgreiche VERHANDLUNGSFÜHRUNG

30. Sept. - 01. Okt. 2004 Seminar

Fortbildung im Gesundheits- und Krankenhauswesen 04/05

- **Krankenhausmanagement**
Fachkurse Sterilisation / Desinfektion
- **Führungstraining, Kommunikation, Teamarbeit**
Konfliktmanagement, Mitarbeiterführung, Rhetorik, Präsentation, Verhandlungsführung,
- **Medizin und Medizintechnik**
onkologische/immunolog. Untersuchungsmethoden Tumorthapien, Röntgen, Strahlenschutz, LSC
- **Biotechnologie**
- **Psychotherapeutische Zusatzausbildungen**
Hypnose, Autogenes Training, Verhaltenstherapie
- **Gedächtnisstörungen / Rehabilitation**
Neuropsychologische Diagnostik, Tests, Gruppentraining
- **Kindertherapie**
Aufmerksamkeitsstörg./Hyperaktivität, Soz. Kompetenz, Hör- und Sprachentwicklung, Kinderhypnose, Kinder-AT
- **Ausbildung zum Supervisor / Praxisberater**
- **Ärztl. Weiterbildung Psychotherapie (Blockform)**

Universität Tübingen



Wilhelmstraße 5, D-72074 Tübingen
07071 / 29-76439, -76872, -75010 FAX: 29-5101
wit@uni-tuebingen.de, <http://www.wit.uni-tuebingen.de/>