



GUIDE DE TEST DE PROVOCATION MICROBIOLOGIQUE DES AUTOCLAVES DE TRAITEMENT DE DECHETS MEDICAUX

INTRODUCTION

Deux des volets du projet PNUD/FEM de gestion des déchets biomédicaux concernent la démonstration de technologies de traitement de déchets biomédicaux non-incinératrices, dont la plus courante est l'autoclave. Le présent document présente un protocole de test de provocation microbiologique pour les tests de validation des autoclaves à déplacement par gravité ou sous vide destinés au traitement des déchets médicaux.

OBJECTIF DU PROTOCOLE DE TEST

L'objectif du protocole d'test est de démontrer la capacité d'un autoclave à traiter efficacement les déchets médicaux selon les normes de traitement reconnues.

PRINCIPES DE BASE ET APPROCHE GÉNÉRALE

L'efficacité du traitement est fonction de la capacité d'un autoclave à modifier ces déchets, de sorte à éliminer ou à diminuer sensiblement leur potentiel de transmission de pathologies. La désinfection et la stérilisation sont des termes souvent employés en termes d'efficacité de traitement. La désinfection peut se définir comme la réduction ou l'élimination des micro-organismes pathogènes (agents pathogènes) dans le but de minimiser les risques de transmission de maladies. La stérilisation est définie comme la destruction de toute vie microbienne. La destruction complète de tous les micro-organismes étant difficile à déterminer, la stérilisation des instruments médicaux et chirurgicaux est généralement exprimée en réduction de $6 \log_{10}$ d'un micro-organisme déterminé, ce qui correspond à une probabilité de survie de la population microbienne d'un millionième (0,000001).

En lieu et place des termes "désinfection" ou "stérilisation", le système de classification STAATT parle de niveaux d'«inactivation microbienne» spécifiquement pour le traitement des déchets biomédicaux. Ce système a été mis en place pour définir les mesures des performances des technologies de traitement de déchets biomédicaux. La norme internationale d'inactivation microbienne dans le traitement des déchets biomédicaux fondée sur les critères STAATT est de niveau III :

Niveau III Inactivation de des bactéries végétatives, des champignons, des virus lipophiles/hydrophiles, des parasites et des mycobactéries à une réduction de $6 \log_{10}$ ou plus, et l'inactivation des spores de *G. stearothermophilus* et de *B. atrophaeus* à une réduction de $4 \log_{10}$ ou plus.

Les indicateurs microbiologiques représentatifs servant généralement à vérifier la conformité à cette norme sont le *Mycobacterium phlei* ou le *Mycobacterium bovis* (BCG) à une réduction de 6 Log₁₀ ou plus, les spores du *Geobacillus stearothermophilus* ou du *Bacillus atrophaeus* résistant à la chaleur, à une réduction de 4 log₁₀ ou plus.

Les spores du *Geobacillus stearothermophilus*, précédemment appelés *Bacillus stearothermophilus*, sont des endospores non pathogènes en sommeil capables de supporter des températures élevées de traitement à la vapeur, ainsi que la chaleur sèche. Les spores du *Bacillus atrophaeus*, précédemment appelées *subtilis* var. *niger*, résistent également à la chaleur sèche et humide, ainsi qu'à l'inactivation chimique. Le tableau 1 présente les principaux types de microorganismes à l'exclusion des prions, en fonction de leur résistance à la désinfection chimique. La même configuration s'applique à la désinfection thermique. En raison de la forte résistance des spores bactériennes, les tests de validation à l'aide de l'« étalon-or » (spores de *stearothermophilus* *Geobacillus* ou d'*atrophaeus* *Bacillus*) constituent généralement l'unique condition requise pour les autoclaves de traitement de déchets.

Tableau 1. Microorganismes répertoriés par ordre décroissant de résistance à la désinfection chimique

MICROORGANISMES	EXEMPLES
SPORES BACTÉRIENNES [LES PLUS RÉSISTANTES]	<i>GEOBACILLUS STEAROTHERMOPHILUS</i> , <i>BACILLUS ATROPHAEUS</i> , <i>CLOSTRIDIUM SPOROGENES</i>
FORMES DE PARASITES À KYSTE	KYSTES DE <i>CRYPTOSPORIDIUM</i>
MYCOBACTÉRIES	<i>MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i> VAR. <i>BOVIS</i> , MYCOBACTÉRIES NON-TUBERCULEUSES
PETITS VIRUS OU VIRUS NON LIPIDIQUES	POLIOVIRUS, VIRUS COXSACKIE, RHINOVIRUS POLIOVIRUS
CHAMPIGNONS	<i>TRICHOPHYTON</i> SPP., <i>CRYPTOCOCCUS</i> SPP., <i>CANDIDA</i> SPP.
LES FORMES DE PARASITES SANS KYTE	
BACTÉRIES VÉGÉTATIVES	<i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> , <i>STAPHYLOCOCCUS AUREAUS</i> , <i>CHLOERAESUIS SALMONELLA</i> , ENTÉROCOQUES
VIRUS LIPIDES OU DE TAILLE MOYENNE [LES MOINS RÉSISTANTS]	VIRUS DE L'HERPÈS SIMPLEX, CYTOMÉGALOVIRUS, VIRUS RESPIRATOIRE SYNCYTIAL (VRS), VIRUS DE L'HÉPATITE B, VIRUS DE L'HÉPATITE C, VIRUS DE L'IMMUNODÉFICIENCE HUMAINE (VIH)

Source : *Sterilization, Part 1: Sterilization in Health Care Facilities*, Arlington: Association for the Advancement of Medical Instrumentation (2006)

La méthode traditionnelle de test des systèmes thermiques humides tels que les autoclaves utilise des endospores placés sur des bandes de papier sec protégés par des enveloppes en papier cristal. Après le traitement, la bande est récupérée, soigneusement enlevée de l'enveloppe « cristal » et transférée dans un flacon de milieu stérile. Dans les 24 heures qui suivent, la bande de test est insérée sous asepsie dans un milieu en bouillon digéré de soja-caséine de 5 ml. Ce processus doit être suivi avec soin afin d'empêcher toute intrusion de bactéries provenant de l'environnement dans le milieu. La bande insérée dans le

milieu de culture est ensuite incubée pendant au moins 48 heures, à 30 °C pour le *Bacillus atrophaeus* et à 55 °C pour le *Stearothermophilus Geobacillus* afin d'assurer la croissance et la reproduction de toute spore survivante. Si le milieu est trouble, cela indique que le traitement par l'autoclave est défectueux.

Toutefois, le présent document recommande une méthode plus simple employée aujourd'hui. Elle implique l'utilisation d'un indicateur biologique (IBA) autonome composé d'une bande à spores placée dans un flacon contenant un milieu de culture dans une ampoule intérieure scellée. Une capsule munie de trous et d'un filtre hydrophobe sert de barrière bactérienne. Le flacon est placé dans une charge d'test et récupéré après le traitement. Le flacon est ensuite pressé jusqu'à la rupture de l'ampoule pour permettre le mélange entre le milieu de culture et la bande à spores traitées. Le flacon est incubé pendant 24 ou 48 heures à une température donnée. L'indicateur biologique autonome pour les autoclaves de traitement de déchets contient une quantité prédéterminée de spores (concentration de 10^4), de sorte qu'un résultat négatif correspond à une réduction de $4 \log_{10}$. Les IBA contenant un indicateur de pH montrent un changement de couleur pour indiquer la survivance de spores et un résultat positif (échec). Une autre méthode se sert d'une ampoule de verre hermétiquement fermée, contenant un milieu de culture et un indicateur de pH. Contenant une population connue d'endospores, chaque ampoule est conservée au réfrigérateur jusqu'à son utilisation et nécessite une période d'incubation de 48 heures. La croissance est mise en évidence par la turbidité et/ou le changement de couleur. Un autre système d'indicateur biologique détecte l'activité d'une enzyme trouvée sur la spore bactérienne. Il a été démontré que la réponse de l'enzyme équivaut à la capacité de multiplication des spores. Cette méthode permet de détecter la fluorescence produite par un indicateur positif. Grâce à sa haute sensibilité, cette méthode donne des résultats en une à trois heures, ce qui a été corrélée avec une période d'incubation de sept jours.

Pour les tests de validation initiale d'un nouvel autoclave, le cycle du processus doit être ajusté jusqu'à ce que les critères de réduction logarithmique soient remplis au moins trois fois de suite après trois tests consécutifs. Les paramètres de fonctionnement correspondant à ces tests couronnés de succès (durée d'exposition, température ou pression) doivent être documentés. Les conditions de fonctionnement concernant toutes les charges futures doivent refléter fidèlement ces paramètres et être enregistrées.

L'approche utilisée dans ce protocole est un test de provocation microbiologique mettant à contribution des indicateurs biologiques autonomes du *Geobacillus stearothermophilus* placés dans des porteurs qui, à leur tour, sont placés dans le sac à déchets pour démontrer une réduction logarithmique des spores bactériennes supérieure ou égale à 4.

PROTOCOLE DE TEST

Général Voici quelques lignes directrices générales concernant le protocole de test :

L'autoclave doit fonctionner dans les conditions normales de fonctionnement.

Les tests doivent être effectués avec les déchets caractéristiques de l'établissement de santé concerné. Une attention particulière doit être accordée aux déchets tranchants/pointus et de culture en laboratoire. Le test doit être mené à l'aide des mêmes réceptacles ou sacs utilisés par l'établissement de santé, et ces derniers doivent être scellés de la manière qui y est généralement pratiquée.

La mise en place du sac de déchets échantillon dans le système de traitement doit tenir compte de des conditions types de mise en place et d'empilement adoptées. En cas de traitement de plusieurs sacs, les indicateurs biologiques doivent être placés dans les sacs poubelles où le traitement est le plus difficile.

Personnel Le test doit être effectué par un personnel spécialement formé à cet effet. Il peut être effectué par un opérateur d'autoclave si ce dernier est convenablement formé et supervisé par un responsable d'établissement.

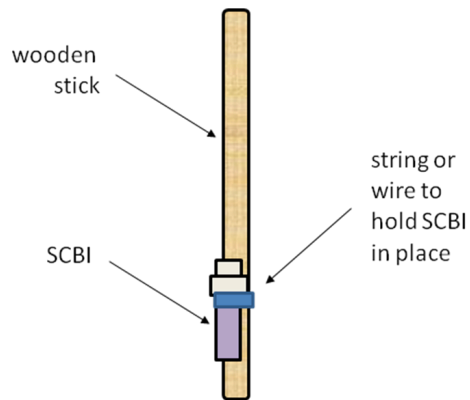
EPI Les procédures de sécurité au travail doivent être suivies lors du test sur des déchets infectieux. Les éléments d'EPI suivants doivent être utilisés lors de l'ouverture des sacs de déchets médicaux, l'introduction des supports dans les sacs, la fermeture des sacs, ainsi que leur placement dans l'autoclave : gant lourds, masque facial, lunettes de protection (ou écran facial), chaussures à semelles dures (ou bottes) et tablier (ou blouse) à porter sur les vêtements ordinaires. Les éléments d'EPI suivants doivent être utilisés lors de la récupération des supports : gants lourds, chaussures à semelles dures (ou bottes), tablier (ou blouse) à porter sur les vêtements ordinaires et écran facial pour la protection contre la vapeur, au besoin. L'EPI doit être nettoyé après chaque utilisation.

Matériaux Les indicateurs biologiques autonomes (IBA) doivent avoir les caractéristiques suivantes (pour des exemples, voir l'annexe A) :

- Indicateur biologique : spores de *Geobacillus stearothermophilus*
- Concentration : $\geq 1 \times 10^4$ ufc/ml
- Valeur D : Supérieure à 1,5 minutes à 121 °C
(Une valeur D > 2 min est suggérée si elle est disponible)

Si l'autoclave traite plusieurs sacs ou autres réceptacles par charge, trois IBA et une solution de contrôle doivent être utilisés pour un test de provocation. Chaque IBA doit être marqué pour distinguer les indicateurs de test et la solution de contrôle. Ces trois IBA doivent être placés dans trois sacs distincts, dont l'une doit être au bas centre de la pile. Si un seul sac est traité par charge, un IBA et une solution de contrôle doivent être utilisés pour un test de provocation.

Les supports doivent être préparés comme indiqué dans le dessin ci-dessous.



SCBI CARRIER
(not drawn to scale)
To be placed inside a sealed medical waste bag

Procédure La procédure suivante concernant le placement, le retrait et l'incubation doit être suivie :

- A. De la charge, trois sacs types de la taille moyenne des sacs à déchets médicaux sont choisis au hasard. Puis, les sacs sont ouverts avec précaution et un support placé à l'intérieur. La tige de bois est positionnée de telle sorte que l'IBA est situé au milieu du sac. Si des sacs intérieurs se trouvent dans le sac de déchets médicaux, le support est placé dans un sac intérieur. Les sacs sont ensuite attachés comme ils l'étaient initialement.
- B. Les trois sacs sont placés un au bas centre, un au milieu et un autre au haut du lot de déchets dans l'autoclave. La solution de contrôle est mise de côté et conservée à température ambiante.
- C. Après avoir rempli l'autoclave de la manière habituelle, le processus de traitement peut commencer.
- D. Les données suivantes doivent être enregistrées : nom de la personne effectuant le test, la date, les paramètres de fonctionnement dont les heures de début et de fin, la description générale des déchets, ainsi que le poids du sac.
- E. Lors de l'enlèvement des sacs de déchets au terme du processus de traitement, les trois sacs contenant les supports sont séparés.
- F. Les IBA sont retirés des supports et des observations faites pour déterminer leur éventuelle détérioration.
- G. Une fois les observations enregistrées, les trois IBA et la solution de contrôle sont incubés en suivant les instructions du

fournisseur d'IBA (généralement 24 heures à une température de 55 à 60 °C). L'incubateur doit être en mesure de maintenir la température à ± 2 °C au cours de la période d'incubation.

- H. Après l'incubation, les ampoules ou les flacons d'IBA doivent être examinés pour déterminer s'il s'agit d'une Croissance ou d'une Non-croissance suivant les instructions du fournisseur d'IBA. Les résultats doivent être enregistrés (voir le formulaire modèle de l'annexe B).

Fréquence Sauf pour le test de validation initiale d'un nouvel autoclave, la fréquence normale des tests de provocation microbiologique est une fois par semaine.

Si tous les indicateurs indiquent une Non-croissance à la suite de quatre tests consécutifs (un mois), la fréquence de test peut être réduite à une fois toutes les deux semaines.

Échec Tout cas d'IBA indiquant une détérioration quelconque pouvant affecter la détermination de l'inactivation microbienne (tels que des flacons fissurés et l'exposition de bandes à spores, des ampoules de verre contenant le milieu de culture ayant une fuite, capsules brisées) doit être consigné dans le rapport, mais ne doit pas être inclus dans la détermination. Pour qu'un test soit valable, il doit y avoir trois IBA intacts, sinon il doit être repris.

Le processus est considéré comme réussi si tous IBA indiquent une Non-croissance. Si un ou plusieurs IBA indiquent une croissance, un processus de résolution de problème doit être entamé pour déterminer la source du problème, par exemple la nécessité d'entretien des équipements ou le réglage des paramètres de fonctionnement (accroissement du temps d'exposition, température, nombre ou profondeur des cycles à vide s'il s'agit d'un autoclave sous vide). Le test doit être repris pour chaque cas jusqu'à ce que tous IBA indiquent une Non-croissance. Le test doit être poursuivi jusqu'à ce que trois tests consécutifs se soldent par une Non-croissance pour tous les IBA. Par la suite, les tests doivent être effectués chaque semaine jusqu'à ce que quatre consécutifs se soldent par une Non-croissance, après quoi la fréquence des tests peut être réduite à une fois toutes les deux semaines.

Dossiers Les dossiers des résultats des tests de provocation microbiologique doivent être mis, sur demande ou périodiquement, à la disposition des autorités de réglementation conformément aux règles existantes. Ces documents doivent être conservés par l'établissement pendant au moins trois ans.

MODIFICATIONS POUR D'AUTRES SYSTEMES DE TRAITEMENT

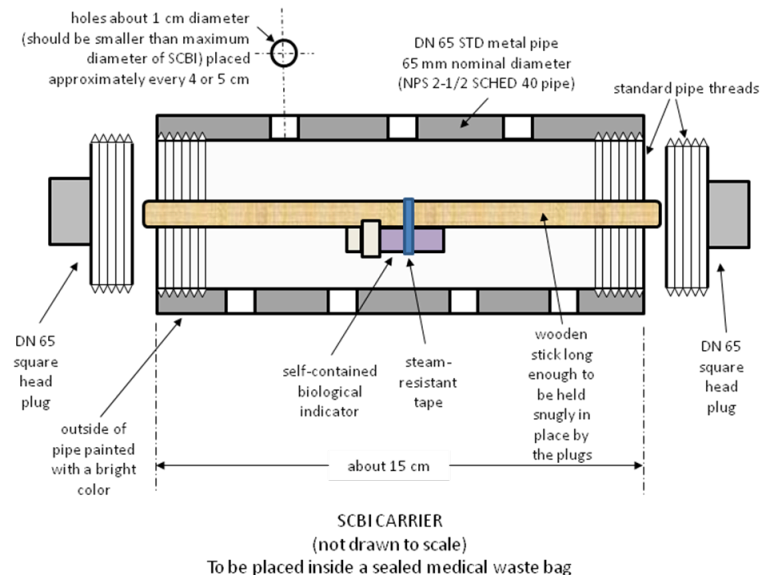
Le présent protocole peut être modifié pour s'appliquer aux unités à micro-ondes et aux systèmes hybrides à vapeur intégrant un dispositif de broyage ou de mélange permettant la rupture des sacs et le

déversement de leur contenu à l'intérieur de l'autoclave ou de la chambre à micro-ondes.

Pour éviter la destruction des IBA par les broyeurs internes, ces indicateurs doivent être introduits dans l'unité de façon à contourner le dispositif de broyage. Pour les unités qui utilisent un bras mélangeur ou une palette et pour les autoclaves à rotation, un support doit être conçu avec les caractéristiques suivantes :

- Relativement petites,
- Facile à ouvrir et à fixer,
- Suffisamment robustes pour la protection des IBA et l'usage répété,
- Conçus pour permettre facilement la pénétration de la vapeur,
- Facilement visibles (par exemple, peintes de couleurs vives) pour la récupération.

Parmi les exemples de conception de supports simples figurent les balles de tennis munies de trous forés sur tout le diamètre, les tubes de Teflon® dotés de trous et de bouchons en bois fixés aux deux extrémités par des fils gros calibre et de tuyaux métalliques courts munis de trous et de capsules filetées aux deux extrémités, comme illustré dans le dessin ci-dessous. Les déchets broyés ainsi que l'indicateur biologique autonome doivent être placés dans le support.



Jorge Emmanuel, PhD et Ed Krisiunas, MT(ASCP), MPH
16 novembre 2010

Ce document a été élaboré par le Projet GEF de l'UNDP sur les Déchets d'Activités de Soins, et il peut être utilisé comme une ressource pour améliorer la gestion des déchets d'activités de soins. Le document bénéficie des droits d'auteur mais il peut être reproduit dans sa forme originale sans permission, au but de témoignage, campagne et formation. La reproduction et la distribution pour la revente commerciale sont strictement interdites. Si plus de cinq copies sont reproduites pour distribution, le UNDP/GEF doit être notifié par email à

<http://www.gefmedwaste.org/contactus.php>. Si des citations des extraits ou des passages courtes sont utilisés, les utilisateurs doivent spécifier correctement la source. L UNDP GEF ne garantie pas que l information contenue dans ce document est complète et correcte et il ne sera pas responsable pour aucun dommage produit suite à son utilisation.

ANNEXE A

Exemples d'articles d'test

Remarque 1 : La mention des produits ci-dessous ne constitue nullement une approbation ou une recommandation du projet PNUD/FEM. Ces produits sont présentés uniquement à titre d'exemple. Il existe d'autres produits répondant aux exigences du présent guide.

Remarque 2 : Ces exemples utilisent des concentrations de spores bactériennes de 1×10^5 . Pour les autoclaves de traitement de déchets, STAATT exige des concentrations de spores bactériennes s'élevant à seulement 1×10^4 . Ainsi, une concentration de 10^5 constitue un critère plus rigoureux, mais peut être plus facile à obtenir commercialement.

Indicateurs biologiques autonomes Raven ProSpore Ampoules ou ProSpore 2

Geobacillus stearothermophilus ATCC 7953, concentration minimale : 1×10^5 cfu/ml
Incubateur à bain sec ProSpore ou ProSpore 2, 12 puits, 240 Volts, 35 ou 55 °C
Raven Labs, P.O. Box 27261, Omaha, NE 68127 USA; TEL : +1-402-593-0781
<http://www.mesalabs.com/products-services/raven-labs.html>

Indicateurs biologiques autonomes 3M™ Attest™

Geobacillus stearothermophilus (dérivé de l'ATCC 7953) dans un flacon en polypropylène souple, population minimale de 1×10^5 spores par bande, comprend un milieu de culture en bouillon trypticase soja avec un colorant indicateur sensible au pH (pourpre de bromocrésol)
incubateur Attest, 220/240 Volts, capacité de 14 flacons, 56 ± 2 °C
3M Center, St. Paul, MN 55144 USA
http://solutions.3m.com/wps/portal/3M/en_US/IP/infectionprevention/solutions/sterilization-assurance/load-control/

Indicateurs biologiques autonomes SporView®

Geobacillus stearothermophilus, population de $2,2 \times 10^5$, résultats en 24 heures
Medical Engineering Technologies Ltd., Yew Tree Studios, Stone Street, Stanford North, Ashford, Kent TN25 6DH, Royaume-Uni; TEL : +44 (0)8454 588924
<http://www.met.uk.com/6a-medical-sterilisation-indicators.php#self-contained-biological>

Indicateurs biologiques autonomes Bionova Terragene

Spores bactériennes *Geobacillus stearothermophilus* sur papier filtre emballé dans un tube en plastique contenant un milieu de culture en ampoule en verre scellé et un indicateur coloré
MedNet GmbH, Borkstraße 10, 48163 Münster, Allemagne; TEL : +49 (0) 251 32266-0
<http://www.medneteuropa.com/Sterilisation-Monitori.14.0.html?&L=2>

APPENDIX B

Journal de test d'indicateur biologique (IB)

Test de provocation

Nom : _____ Date du test : _____

Adresse: _____

Marque de l'IB : _____ Concentration : _____

N°/Lot du produit : _____ Date d'expiration : _____

Autoclave/Numéro de modèle : _____

Paramètres de fonctionnement de l'autoclave : _____

Heure de début de cycle : _____

Heure de fin de cycle: _____

Description des sacs de déchets choisis pour les IBA

N° de l'échantillon	Poids (kg)	Description des déchets	Emplacement dans l'autoclave
1			
2			
3			

Résultats des tests

Contrôle nég.	
N° de l'échantillon	Résultats
1	
2	
3	
Contrôle positif	

Le contrôle négatif se réfère à un indicateur biologique non traité
Enregistrer les résultats en "+" pour le résultat Croissance (échec)
et "NG" pour le résultat Non-croissance

Observations / Conditions de perturbation pendant le test le cas échéant :
