



Reçu le :
1 mars 2010
Accepté le :
26 août 2010

Disponible en ligne sur
 ScienceDirect
 www.sciencedirect.com

Limitons la contamination des combinaisons stériles en zone à atmosphère contrôlée de préparation des mélanges de nutrition parentérale

Reduced contamination of integral protective suits in a clean room of parenteral nutrition

J. Grangé^{a,1}, S. Nguyen^{b,1}, J. Bordenave^{c,*,2}, G. Benoit^{c,3}

^a Service de pharmacie, hôpital Charles-Foix, 7, avenue de la République, 94205 Ivry-sur-Seine, France

^b Service de pharmacie, hôpital Tenon, 4, rue de la Chine, 75020 Paris, France

^c Service de pharmacie, hôpital Armand-Trousseau, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, 26, avenue du Docteur-Arnold-Netter, 75012 Paris, France

Summary

Introduction. Manufacturing process of parenteral nutrition (PN) in clean room requires a strict survey of environmental microbiological contamination. In the clean room of our hospital's pharmacy, the staff wears integral protective suits made of polyester with open hood, the main function of which being to protect the products and the environment from any human contamination.

Objective. The objective of this study was to determine the level of microbiological contamination of the suits during the production on several localizations and at different times, then to evaluate the impact of an additional protection which are sterile single use polyethylene arm covers sleeves.

Method. First, a total of 160 samplings with Agar Countact[®] on combinations were carried out from the staff working in A class (ISO 5) clean room at T0, T1 H, T2 H, T4 H, T5 H. Then, after the introduction of additional sleeves, 120 samplings (60 on protect-arms and 60 under protect-arms, on the combination) were carried out.

Results. The study showed that microbiological contamination increases with time, sometimes after 1 hour of stay in the clean room. Forearms are the crucial site, and the use of arm covers

Résumé

Introduction. Dans le processus de fabrication de poches de nutrition parentérale en zone à atmosphère contrôlée (ZAC), la maîtrise de la contamination microbiologique de l'environnement est une priorité. Dans l'unité de nutrition parentérale de notre hôpital, le personnel est revêtu de combinaisons intégrales stériles en polyester dont le rôle premier est de protéger l'environnement et les préparations de toute contamination d'origine humaine.

Objectif. L'objectif de cette étude a été de déterminer la contamination microbiologique des combinaisons en cours de fabrication puis d'évaluer l'impact de l'utilisation d'une protection complémentaire, des protège-bras en non-tissés stériles à usage unique.

Matériels et méthodes. Dans un premier temps, un total de 160 prélèvements sur les casques, par géloses de type « contact », ont été réalisés sur le personnel manipulant en classe A à différents temps de présence dans l'unité. Dans un second temps, après la mise en place des protège-bras, 120 prélèvements (60 sur les protège-bras, 60 sur la combinaison sous les protège-bras) ont été effectués.

Résultats. Cette étude a montré que la contamination microbiologique augmente au cours du temps et les normes sont dépassées après une heure de présence dans la ZAC. Les avant-bras constituent

* Auteur correspondant.
e-mail : joelle.bordenave@trs.aphp.fr

¹ Pharmacien assistant.

² Praticien hospitalier.

³ Pharmacien chef de service.

significantly reduces the microbiological contamination at this localization.

© 2010 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Keywords: Clean-room, Parenteral nutrition, Wearing, Security, Microbial contamination, Protect-arms

Introduction

La pharmacie de l'hôpital Armand-Trousseau produit environ 11 000 poches de mélanges pour nutrition parentérale par an en zone à atmosphère contrôlée (ZAC). La ZAC est caractérisée par un nombre maximum autorisé de particules en suspension dans l'air ainsi qu'une qualité microbiologique de l'environnement [1-3]. La préparation des mélanges est réalisée sous hotte à flux d'air laminaire horizontal en classe d'empoussièrement particulaire A dans un environnement immédiat de classe B [3]. Les procédures de travail mises en place dans cette ZAC doivent garantir la stérilité des préparations [4].

Le maintien de l'asepsie des procédés de fabrication et la maîtrise de la contamination particulaire et microbiologique de l'environnement est une priorité. Quelle que soit la performance des installations, l'homme est le principal émetteur de contaminants particuliers par son activité et ses vêtements. La peau est naturellement colonisée par une flore bactérienne résidente composée, entre autres, de *Staphylococcus epidermidis*, de microcoques et de corynébactéries. Des germes pathogènes (*Staphylococcus aureus*...) peuvent également y proliférer avant d'être relargués par desquamation [5,6]. Le rôle premier de l'habillement est d'isoler l'opérateur de son environnement afin de limiter les émissions microbiennes et particulaires. La combinaison stérile constitue une barrière essentielle vis-à-vis de la flore bactérienne cutanée. Dans notre unité de nutrition parentérale, le personnel est revêtu de combinaisons intégrales stériles en polyester à cagoule ouverte (Initial France), d'un masque chirurgical stérile (Lohman et Rauscher) et de gants chirurgicaux stériles en latex (Gammex®, Ansell). Des comptages particuliers ont montré que cette tenue permettait de respecter les exigences requises par la norme ISO 14664 [1,7] et les bonnes pratiques de préparation (BPP) [3] en termes de particules en suspension dans l'air pour les différentes classes de la ZAC. Suite à la mise en évidence de contaminations microbiologiques des surfaces et des gants des opérateurs lors de contrôles de routine, des investigations complémentaires ont été mises en œuvre pour en rechercher l'origine. Une étude visant à évaluer la contamination microbiologique des combinaisons au cours de la journée de fabrication a été conduite afin de vérifier que les normes en activité définies par les BBP [3] étaient respectées tout au long de la journée de fabrication. Dans un second

le site le plus critique et l'utilisation de protège-bras réduit la contamination microbiologique de cette zone.

© 2010 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Mots clés : Nutrition parentérale, Salle propre, Combinaison, Contamination microbiologique, Protège-bras, Maîtrise

temps, la tenue des opérateurs a été modifiée et l'impact de cette mesure sur la contamination de l'habillement a été évalué.

Matériels et méthodes

Contrôles microbiologiques des combinaisons stériles

Le mode de fonctionnement de l'unité prévoit qu'un à deux opérateurs en fonction du nombre de préparations à réaliser travaillent sous hotte à flux d'air laminaire. Un troisième opérateur assure le transfert du matériel et des matières premières sous la hotte. C'est la contamination microbiologique des combinaisons des opérateurs travaillant sous hotte à flux d'air laminaire qui a été évaluée. En effet, ces opérateurs doivent à la fois répondre aux exigences de la classe A (avant-bras et mains sous la hotte) et à celles de la classe B (reste du corps). Conformément à l'annexe D de la norme ISO/DIS 14698-1 [2], relative à la biocontamination des textiles, des prélèvements ont été réalisés à l'aide de boîtes de géloses de type « contact » contenant un milieu trypticase soja (55 mm de diamètre, laboratoire Biotest) permettant le dénombrement de la flore totale (bactéries aérobies, levures et moisissures) [8]. Ces géloses contiennent des agents neutralisants vis-à-vis des désinfectants utilisés pour le bionettoyage de l'unité.

Les prélèvements ont été effectués à différents temps : immédiatement après habillage ou après une, deux, trois, quatre, ou cinq heures de présence dans la ZAC (To, T1 h, T2 h, T3 h, T4 h et T5 h).

Vingt séries de prélèvements, soit 160 prélèvements, ont été réalisées dont trois séries à To, trois à T1 h, trois à T2 h, quatre à T3 h, quatre à T4 h et trois à T5 h.

Sur chaque combinaison, huit sites ont été prélevés : la nuque, les deux bras, les deux avant-bras, le sternum, l'abdomen et une des bottes. La méthode de prélèvement a été standardisée [2]. Tous les prélèvements ont été réalisés par un même opérateur afin d'avoir une méthode de prélèvement la plus reproductible possible, la pression exercée sur la boîte de gélose étant difficile à standardiser sur la combinaison.

Une application de dix secondes de la gélose sur la combinaison était réalisée avant la sortie de l'opérateur de la ZAC. Les géloses ont été incubées pendant trois jours à 30 °C puis sept jours à 25 °C, afin de mettre en évidence la flore bactérienne et fongique.

Le dénombrement des colonies présentes sur les géloses a été réalisé à j1, j3, j6 et j10.

Contrôles microbiologiques des protège-bras

Afin d'améliorer la protection et de limiter la contamination microbiologique des combinaisons observées dans la première phase de l'étude, la tenue a été complétée par des protège-bras stériles à usage unique en non-tissé, laminés triples couches (Foliodrape protège-bras, laboratoire Hartmann) couvrant les avant-bras du poignet jusqu'au coude. Ils sont mis en place sur les manches de la combinaison lors de l'installation de l'opérateur sous le flux d'air laminaire (fig. 1). Des prélèvements ont été réalisés en fin de fabrication au moment de la sortie du flux d'air laminaire de l'opérateur, en ZAC. Il a été défini que le temps minimal de présence dans l'unité devait être de trois heures, temps au bout duquel une contamination de la combinaison a été observée dans la première partie de l'étude. Deux sites pour chaque protège-bras ont été prélevés, puis deux sites directement sur chaque avant-bras de la combinaison sous le protège-bras, soit une série de huit points de prélèvement par opérateur. Quatorze séries de prélèvements ont été réalisées, soit 112 prélèvements : dix séries de prélèvements après trois heures de présence dans l'unité (T3 h), trois séries à T4 h et une série à T5 h. Cette étude a été réalisée dans des conditions normales de fonctionnement de l'unité. Les prélèvements étant réalisés en fin de fabrication et



Figure 1. Tenue des opérateurs : combinaisons intégrales et protège-bras. Operators clothes: integral protective combinations and Foliodrape® arm covers sterile.

le temps de présence des opérateurs dans l'unité étant en moyenne de trois heures, le nombre de prélèvements à quatre et cinq heures est moins important.

Les prélèvements, le traitement des géloses et le dénombrement des colonies ont été réalisés selon les modalités décrites précédemment.

Le pourcentage de prélèvements mettant en évidence la présence de colonies a été calculé.

Afin de déterminer si l'origine de la contamination microbienne était humaine ou environnementale, le service de bactériologie a procédé à une identification des colonies.

Contrôles microbiologiques des gants

Le mode opératoire de fabrication de nos préparations stériles prévoit que l'opérateur travaillant sous flux d'air laminaire enfile une seconde paire de gants. Cette seconde paire de gants doit être changée toutes les 15 minutes au cours de la fabrication. Cet intervalle de 15 minutes a été défini au vu des résultats des prélèvements de gants réalisés quotidiennement. Il permet d'obtenir des résultats de contrôle des gants satisfaisants et donc de minimiser le risque de contamination des préparations tout en restant compatible avec la fabrication : ce temps permet de fabriquer en moyenne cinq préparations.

En fin de fabrication, moment où la contamination de l'environnement est maximale, des prélèvements de chacun des gants de l'opérateur ont été réalisés par la technique des empreintes à l'aide de boîtes de Pétri contenant une gélose à base de trypticase-soja (géloses TS, 90 mm de diamètre, Laboratoire Biomérieux). Ces géloses ont été incubées trois jours à 30 °C puis sept jours à température ambiante. Elles ont été lues à j1, j3, j6 et j10 et une identification des colonies a été réalisée. Le pourcentage mensuel de prélèvements de gants contaminés pendant les neuf mois précédant l'utilisation des manchettes a été comparé à celui des huit mois suivant la mise en place de cette nouvelle mesure afin d'en mesurer l'impact. Concernant le niveau de contamination microbiologique, les BPP [3] recommandent une absence de contamination microbiologique dans les ZAC en classe A en activité, c'est-à-dire sur les gants et les avant-bras du manipulateur.

Sur le reste de la combinaison située en classe B, jusqu'à cinq colonies par gélose sont acceptées.

Résultats

Contrôles microbiologiques des combinaisons stériles

Toutes les géloses des prélèvements effectués à T0 sont restées stériles après dix jours d'incubation.

Chez certains opérateurs, les normes de contamination microbiologique en classes A et B sont dépassées après une heure seulement de présence dans la ZAC (fig. 2). Après trois heures, on observe une très forte augmentation de la contamination quel que soit le site de prélèvement.

Site de prélèvement Temps passé en ZAC	Zone en classe B						Zone en classe A	
	Nuque	Botte	Sternum	Abdomen	Bras droit	Bras gauche	Avant-bras droit	Avant-bras gauche
T _{0h}	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0
T _{1h}	1	0	0	0	0	0	9	0
	0	0	0	0	2	0	0	0
	9	0	0	0	0	1	0	0
T _{2h}	0	0	0	0	0	0	0	1
	0	9	2	0	3	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0
T _{3h}	0	0	0	1	0	0	0	0
	2	6	3	0	2	0	0	0
	1	0	0	0	1	10	0	0
	7	1	0	1	0	1	1	2
T _{4h}	0	0	0	0	1	0	0	0
	1	0	0	3	6	0	0	0
	50	13	2	8	1	3	2	13
	50	0	0	6	0	1	0	0
T _{5h}	1	0	0	1	0	0	0	0
	50	0	1	0	0	2	0	0
	50	14	15	3	14	5	8	2

Figure 2. Contamination microbologique des combinaisons en fonction du temps passé en zone d'atmosphère contrôlée (ZAC) et du site de prélèvement : chaque ligne du tableau représente une série de prélèvements chez un opérateur. Les résultats sont exprimés en nombre de colonies par gélose. Les résultats non conformes au regard des normes [3] sont présentés dans des cases grisées.

Microbiological contamination of combinations according to the time passed in the clean room and to the site of sampling: every line of the picture represents a series of samplings for one operator. The results are expressed in number of colonies by agar unit. The noncorresponding results regarding the standards [3] are presented in tinted compartments.

Contrôles microbiologiques des protège-bras

La *fig. 3* présente le pourcentage de prélèvements des avant-bras contaminés réalisés parallèlement sur la manche de la combinaison et sur le protège-bras en fonction du temps de présence dans l'unité.

On observe que le port de protège-bras conduit à une diminution presque totale de la contamination de cette zone, alors qu'en l'absence de cette protection après quatre heures de présence en ZAC, plus de 70 % des prélèvements sont positifs.

Nature de la contamination des combinaisons et des protège-bras

Parmi les 19 prélèvements positifs (protège-bras et combinaisons) dont les bactéries ont pu être identifiées, neuf géloses étaient colonisées par une souche de *Staphylococcus epidermidis* (47,4 %), quatre par une souche de *Micrococcus spp.* (21,1 %), cinq sans flore prédominante

(26,3 %) et une à bacille Gram négatif du type *Pseudomonas spp.* (5,3 %).

Évolution de la contamination microbologique des gants durant la période de l'étude

La *fig. 4* montre l'évolution du pourcentage de gants contaminés avant et après l'ajout des protège-bras à la tenue des opérateurs. Au début de l'étude, le pourcentage mensuel de contamination des gants se situait entre 0 et 14 %, soit en moyenne $6,6 \pm 4,7$ %. À partir de l'utilisation de protège-bras stériles, ce pourcentage est de 0 à 4,4 %, soit en moyenne $2,5 \pm 1,4$ %.

Discussion

Les vêtements sont des réservoirs de squames cutanées colonisées par la flore commensale de la peau [9]. Or cette

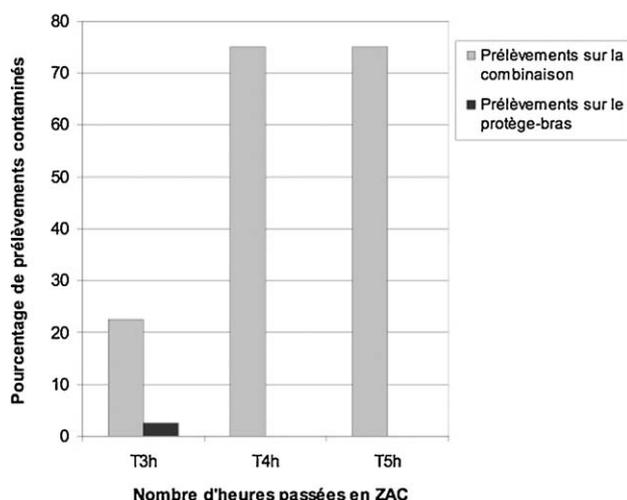


Figure 3. Contamination des avant-bras avec et sans protège-bras : résultats exprimés en pourcentage de prélèvements contaminés. T3 h : n = 40 ; T4 h : n = 12 ; T5 h : n = 4 (T4 h et T5 h : 0 prélèvement contaminé sur les protège-bras).

Forearm contamination with and without protect-arms: data: percentages of contaminated samplings. T3 H n = 40; T4 H n = 12; T5 H n = 4 (T4 H and T5 H: no contaminated samplings on arm covers).

dissémination de squames est la première source de contamination de l'environnement des ZAC [10].

La prévention de la contamination microbiologique de l'environnement passe donc par le choix de la tenue et de la composition de celle-ci [10]. Une tenue dite « intégrale », couvrant tout le corps, présente l'intérêt d'assurer une protection efficace contre le phénomène de desquamation cutanée. En effet, la tenue classiquement utilisée aux blocs opératoires, composée d'un pyjama et d'une casaque chirurgicale, est à l'origine d'une contamination par la partie basse du corps non couverte. Ainsi, la majorité des bactéries excrétées dans l'air proviennent de cette partie du corps [10]. Habiller les extrémités inférieures s'avère donc important. Le choix de la composition de la tenue est également primordiale [10]. Ainsi, une étude comparant des tenues de bloc

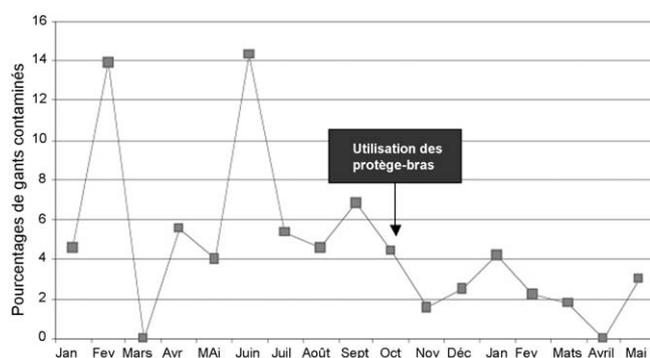


Figure 4. Évolution du pourcentage de gants contaminés avant et après modification de la tenue des opérateurs par l'utilisation de protège-bras. Percentage of contaminated gloves evolution before and after the introduction of additional arm covers.

opérateur a montré une diminution significative de la contamination lors de l'utilisation de tenue au maillage plus fin [9]. De plus, la colonisation par les micro-organismes, selon leur capacité d'adhésion, varie en fonction des matériaux constituant la tenue, de la présence ou non de macro- ou de microrugosités [11]. À ce titre, la combinaison utilisée par nos opérateurs, une combinaison intégrale en polyester, est une solution adaptée.

Pourtant, notre étude montre qu'il existe une contamination microbiologique des combinaisons au cours du temps. Les prélèvements réalisés juste après l'habillage démontrent que cette étape n'est pas une source de contamination des combinaisons.

Au-delà de trois heures de présence en ZAC, le nombre de colonies dépasse les normes définies par les BPP [3] pour la plupart des sites de prélèvement. Cette contamination varie en fonction de l'opérateur et du site de prélèvement. Ces résultats sont concordants avec ceux d'une étude montrant d'une part que le phénomène de desquamation cutanée varie d'un individu à l'autre, les hommes dispersant significativement plus de *Staphylococcus aureus* que les femmes et, que d'autre part, la desquamation est accentuée par le frottement des vêtements [10]. Ainsi, dans notre étude, les zones les plus contaminées correspondent aux zones de frottement et de contact direct avec la peau (nuque, avant-bras). Il semble qu'une certaine perméabilité de la combinaison apparaisse au cours du temps, permettant le passage de micro-organismes de la peau. Ce phénomène a été décrit par Charnley et al. qui ont montré que les particules émises via la desquamation du chirurgien pouvaient pénétrer sa tenue [12]. Ce fait est corroboré par l'identification des colonies qui a mis en évidence une prédominance de *Staphylococcus epidermidis* et de *Micrococcus spp.*, micro-organismes commensaux de la flore cutanée [13].

Ce phénomène est particulièrement préoccupant au niveau des avant-bras. En effet, ces derniers se trouvent sous le flux d'air laminaire, zone de classe A, et devraient donc être stériles. Nos résultats montrent que les normes ne sont plus respectées dès la première heure de fabrication. Il en résulte un risque de contamination du matériel placé sous la hotte à flux d'air laminaire, des gants de l'opérateur et des préparations.

Il faut noter qu'au moment de l'entrée dans l'unité, avant de revêtir la combinaison, les opérateurs procèdent à un lavage chirurgical des mains incluant les avant-bras à l'aide de povidone iodée (Bétadine scrub 4 %®, Meda Pharma), selon les recommandations du C. Clin Paris-Nord [14]. Malgré cette mesure, nos résultats démontrent qu'un développement microbien au niveau de cette zone se produit et entraîne la contamination des avant-bras de la combinaison.

Pour remédier à ce problème, l'habillage de l'opérateur manipulant sous flux a été complété de protège-bras stériles. Les prélèvements réalisés parallèlement sur les avant-bras des

combinaisons et sur les protège-bras démontrent que cette protection supplémentaire permet à la tenue de l'opérateur d'assurer son rôle de barrière.

Depuis la mise en place de cette mesure, une diminution de la contamination des gants des opérateurs a été constatée, ce qui laisse supposer que l'origine des micro-organismes retrouvés sur les gants provenait pour partie des avant-bras.

Même si la biocontamination environnementale n'implique pas nécessairement la contamination des préparations pharmaceutiques, et cela d'autant plus que la fabrication est ici réalisée en système clos [15], il est essentiel de maîtriser la qualité microbiologique de l'environnement de la zone de préparation. Ainsi, il semble important de limiter le temps de présence du personnel en ZAC puisque, dès quatre heures, le nombre de colonies présentes sur les combinaisons dépasse les normes exigées en classe B.

Conclusion

Les prélèvements effectués sur les combinaisons stériles en cours de fabrication ont montré une contamination préoccupante des avant-bras, en particulier à partir de trois heures de présence dans la ZAC. Malgré des installations performantes, une surveillance microbiologique de l'environnement et des évaluations régulières des pratiques, le personnel reste donc la source potentielle majeure de contamination. En effet, les micro-organismes retrouvés sur les avant-bras sont en majorité des bactéries de la flore cutanée commensale. Cependant, l'utilisation de protège-bras a permis de diminuer la contamination microbiologique des avant-bras de manière importante, et ce jusqu'à cinq heures de présence dans l'unité, ainsi que la contamination microbiologique des gants. Les protège-bras stériles à usage unique constituent ainsi une mesure corrective simple à mettre en œuvre et visiblement efficace.

Conflit d'intérêt

Aucun.

Références

- [1] Afnor. Norme NF en ISO 14664-1. Salles propres et environnements maîtrisés apparentés. Partie 1 : Classification de la propreté de l'air ;1999.
- [2] Afnor. Norme NF en ISO 14698-1. Salles propres et environnements maîtrisés apparentés-maîtrise de la biocontamination. Partie 1 : Principes généraux et méthodes;2004.
- [3] Journal officiel de la République française. Décision du 5 nov 2007 relative aux bonnes pratiques de préparation (JORF n° 270 du 21/11/2007, p19029 et Bulletin officiel n° 2007/7 bis, fascicule spécial du ministère de la Santé, de la Jeunesse et des Sports, Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé).
- [4] Corriol O, Crauste-Manciet S, Arnaud P, et al. Recommandations pour la préparation des mélanges de nutrition parentérale. *Nutr Clin Metabol* 2005;19:30–55.
- [5] Guichard JC. Le personnel et le risque de contamination de salle propre. *Salles Propres* 2007;48:55–61.
- [6] Surveillance microbiologique de l'environnement dans les établissements de santé : air, eaux et surfaces. Ministère chargé de la santé, DGS/DHOS, CTIN;2002.
- [7] Afnor. Norme NF en ISO 14664-2. Salles propres et environnements maîtrisés apparentés. Partie 2 : Spécifications pour les essais et la surveillance en vue de démontrer le maintien de la conformité avec l'ISO 14644-1;2000.
- [8] Duez C, Pons-Kerjean N, Paycha F, et al. Mise en œuvre de procédures d'hygiène et de contrôles physiques et microbiologiques d'environnement au sein d'une unité de radiopharmacie. *Ann Pharm Fr* 2009;67:419–26.
- [9] Tammelin A, Domicel P, Hambraeus A, Stahle E. Dispersal of methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* by staff in an operating suite for thoracic and cardiovascular surgery: relation to skin carriage and clothing. *J Hosp Infect* 2000;44:119–26.
- [10] Aho Glélé LS, Fournel M, Tiv M, Astruc K, Cetre JC. Émissions de micro-organismes dans les établissements de santé. *Salles Propres* 2009;61:21–6.
- [11] Bellon-Fontaine N, Dubois Brissonnet F, Henry JM, Meyleuc T, Naï Tali M, Renault M, et al. La biocontamination des surfaces côté matériau. *Salles Propres* 2008;58:25–32.
- [12] Charnley J, Eftekhari N. Penetration of gown material by organisms from the surgeon's body. *Lancet* 1969;25(7587):172–3.
- [13] Teyssou R, Koeck JL, Buisson Y. La flore cutanée. *Rev Fr Lab* 1997;291:49–55.
- [14] C. Clin Paris-Nord. Hygiène des mains – Guide de bonnes pratiques (en ligne). Disponible sur : <http://www.sfm.org>; 2001.
- [15] Maia S, Nicol B, Rouleau A, Guilloteau D, Van Der Mee-Marquet N. Contamination microbiologique en radiopharmacie : problématiques et mise en œuvre de contrôles dans le cadre d'une démarche qualité. *Pharm Hosp* 2008;43(172):11–7.