

# **Méthodes de Contrôle Microbiologique de l'Environnement Hospitalier**

**La surveillance biologique de l'environnement hospitalier** consiste principalement en des **contrôles de surfaces, d'air et d'eau** afin de **détecter les éventuelles contaminations microbiennes** présentes malgré les protocoles de ménage ou les systèmes de ventilation mis en place.

De quoi parle-t-on exactement ?



Eau  
Air  
Surfaces



La surveillance biologique peut aussi **permettre de mettre en évidence un réservoir environnemental de germes saprophytes responsables d'infections opportunistes.**

# Indications de la surveillance de l'environnement

## 1- Contrôle à **visée de qualification**

- ✓ avant le démarrage d'une activité dans un nouvel environnement (Bloc opératoire, circuit de dialyse, flux laminaire)

## 2- Contrôle à **visée de surveillance (Respect des procédures)**

- ✓ de la qualité de **bio-nettoyage**
- ✓ lors de travaux générant un risque infectieux (*Aspergillus, Legionella..*)
- ✓ des procédures de **maintenance technique** d'une installation

## 3- Contrôle à **visée d'investigation d'enquête épidémiologique** :

- ✓ recherche d'un réservoir à BMR qui peut être à l'origine de cas groupés

## 4- Contrôle à visée **pédagogique** dans le but d'une :

- ✓ visualisation de la qualité microbiologique de l'environnement
- ✓ sensibilisation et motivation du personnels

# Surveillance des surfaces de l'environnement hospitalier

## Objectifs

1. Vérifier la bonne application des procédures de nettoyage
2. Evaluer le niveau microbiologique pour une activité donnée

## Indications

**1- Essentiellement a visée pédagogique dans les secteurs à haut risque infectieux :** les services de réanimation, de brûlés, hématologie, les blocs opératoires et chirurgie orthopédique, imagerie interventionnelle, pédiatrie et néonatalogie **chaque 3 à 6 mois**

**2- Travaux dans le secteur maîtrisé ou un secteur adjacent**

**3- Survenue d'une épidémie, en fonction de l'écologie du microorganisme concerné**

**4- Indicateurs de résultats dans une démarche qualité globale ou dans un plan de contrôle.**

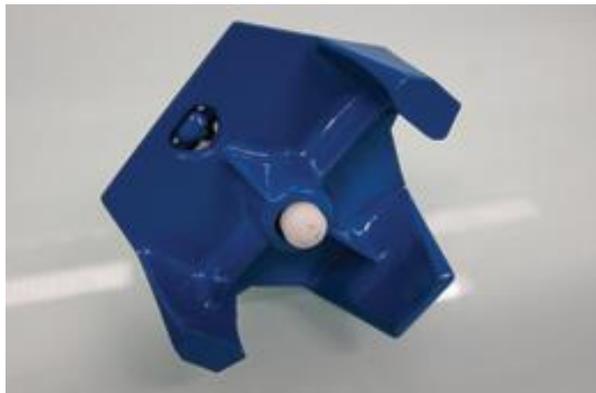
# Méthodes de contrôle microbiologique des surfaces

- **Gélose contact**
  - Avantage : numération des bactéries présentes.
  - Inconvénient : impossibilité de prélever certaines surfaces (ex : poignées de porte,...).
- **Lame gélosées pliantes**
  - Avantage : numération des bactéries présentes.
  - Inconvénient : impossibilité de prélever certaines surfaces
- **Écouvillonnage**
  - Avantage : permet de prélever tous les types de surfaces
  - Inconvénient : Non standardisé : numération des germes difficile
- **ATP-métrie**
  - Avantage : numération des microorganismes viables mais non cultivables
  - Inconvénient : mesure d'ATP dans les cellules vivantes ou non, microbiennes ou non.

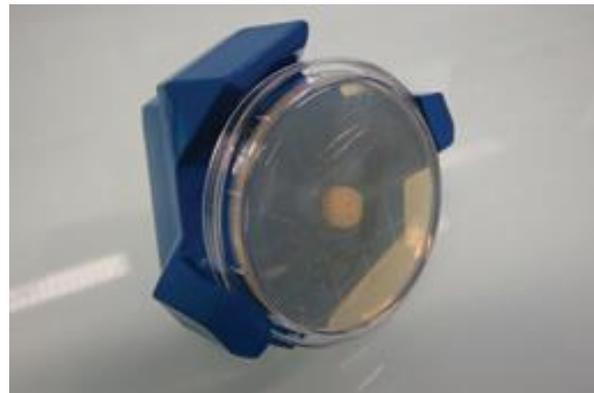
# I. Gélose contact

## 1. Application de boîte de type « count-tact » ou boîte Rodac

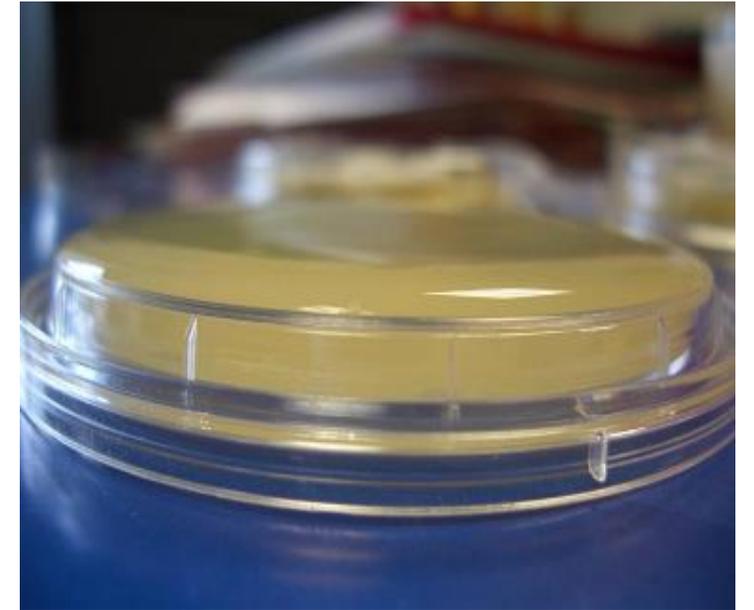
- Boîte de Pétri possédant un **ménisque de milieu de culture convexe** offrant une surface de contact de **25 cm<sup>2</sup>**
- Cette technique est adaptée aux surfaces planes, lisses et sèches
- Elle permet d'obtenir un résultat quantitatif/**25 cm<sup>2</sup>**
- Une **pression uniforme et constante** est appliquée sur la surface pendant quelques secondes (**standardisation**)



Applicateur pour prélèvement de surface par boîte contact



Positionnement de la boîte contact dans l'applicateur



Profil convexe d'une boîte contact

- **Empreintes gélosées standardisé** : Une pression uniforme est obtenue par utilisation d'une d'un **applicateur** ou d'une **masse** et d'un **chronomètre**



**Applicateur Count-tact**  
**25g/cm<sup>2</sup> pdt 10s**

**Prélèvement de surface par boîte contact avec applicateur**



**200g pdt 2min**  
**500g pdt 10s**

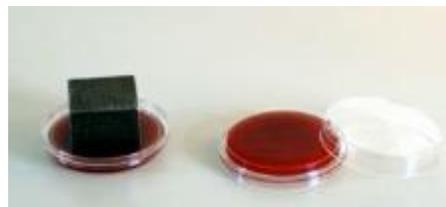
**Prélèvement de surface par boîte contact avec masse**

**Différents milieux de cultures** sont utilisés pour la recherche du **nombre total viable de microorganismes** :

- **La flore totale** : gélose TSA (Trypticase Soja Agar) ou PCA (Plate Count Agar)

- **Recherches spécifiques** à savoir les :

- entérobactéries et coliformes : Gélose VRBG et VRBL
- Staphylocoques : Gélose Baird Parker
- Streptocoques : Gélose Slanetz et Bartley
- *Pseudomonas* : Gélose Cétrimide
- levures et moisissures : Gélose Sabouraud au chloramphénicol



**Neutralisant de désinfectant** : Les milieux sont additionnés d'un ou de plusieurs neutralisants actifs sur les **produits détergent-désinfectants**.

➔ Les plus courants sont le Tween 80, la lécithine, le thiosulfate de sodium, la L-histidine

## Transport et délai d'acheminement

- Les échantillons sont placés dans un conditionnement évitant tout risque de contamination externe et identifié : date, heure, lieu des prélèvements
- **Les échantillons ne doivent pas être réfrigérés**
- Le transport ne dépasse pas les 24 heures à température ambiante



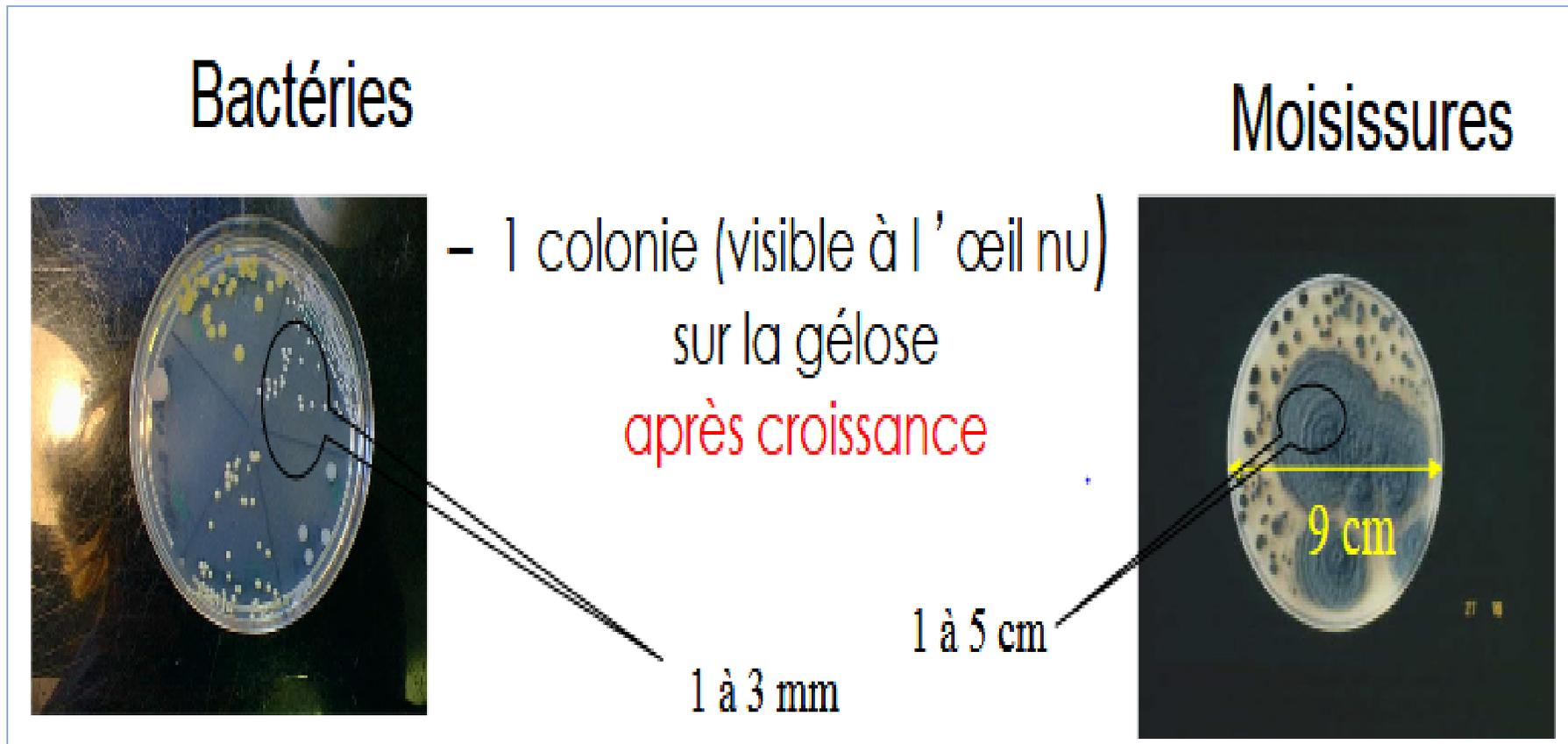
**Positionnement de boîtes dans l'étui de transport**

## Température et temps d'incubation

- $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$  pour la FAT (y compris flore fongique) pendant 5 à 7 jours,
- $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$  pour une recherche ciblée de flore fongique pendant 5 à 7 jours.

## Critères d'interprétation des résultats

- **quantitatifs** : nombre d'UFC/25 cm<sup>2</sup> → **Sans identification** des microorganismes **en routine**
- **qualitatifs** si nécessaire → Identification de microorganismes **ciblées**



## Critères d'interprétation des résultats

### Selon ASPEC

Association pour la **P**révention et l'**E**tude de la **C**ontamination : contrôles de l'environnement dans les zones à hauts et très hauts risques infectieux (**APEC**).

	ZONE A HAUTS RISQUES INFECTIEUX (Zone 3)		ZONE A TRES HAUTS RISQUES INFECTIEUX (Zone 4)	
	Bactéries	Moisissures	Bactéries	Moisissures
	Unité: UFC/25 cm <sup>2</sup>			
Niveau d'action	25	1	10	1
Niveau d'alerte	10	1	5	1
Niveau cible	5	<1	<1	<1

## II. Écouvillonnage des surfaces

Cette technique doit être uniquement utilisée dans 2 cas précis :

- **Recherche d'un germe spécifique** (champignons filamenteux ou enquêtes épidémiologiques) **sur une surface plane**
- **Recherche de germes dans une zone difficilement accessible et non plane ou plus grandes que celle des boîtes contact.**



Ecouvillon floqué

Cette technique est utilisée dans le cadre d'études sur

- La vérification de l'efficacité du nettoyage
- L'identification des agents pathogènes spécifiques
- La clarification des épidémies



# Modalité de prélèvement



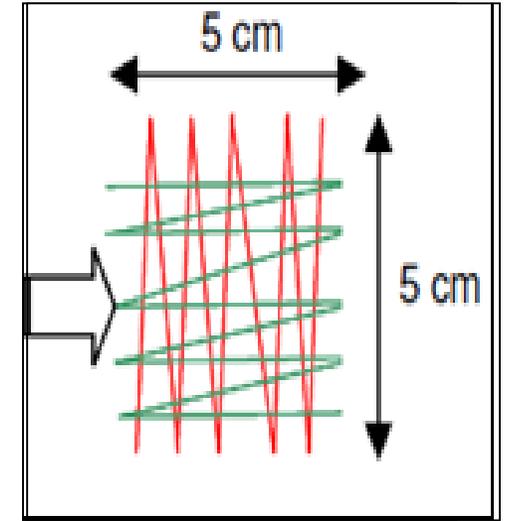
## Humidification de l'écouvillon

Eau distillée stérile,  
Sérum physiologique,  
Bouillon nutritif

+ Neutralisant



Passer l'écouvillon en stries parallèles rapprochées,  
en le faisant tourner légèrement



Technique de prélèvement

**La Norme ISO 18593 (2004)** suggère une surface minimale à couvrir entre 20 et 100 cm<sup>2</sup>, calibrée si possible avec **un gabarit pour standardiser la technique et obtenir un résultat**



## Conditions de transport

- L'écouvillon est transporté au laboratoire dans son étui protecteur
- L'écouvillon doit être **maintenu à  $5^{\circ}\pm 3^{\circ}\text{C}$**  si le délai d'acheminement est **supérieur à 4h**
- Le temps de transport ne dépasse pas **24h**

## Milieux et conditions de culture

- Milieux de culture ordinaires, sélectifs et chromogènes
- ensemencement :
  - **Directement par épuisement** de l'écouvillon sur le milieu de culture choisi
  - **Après enrichissement** en bouillon sélectif ou non pour une **recherche ciblée**

## Température et temps d'incubation

- Température optimale de croissance des microorganismes recherchés : exemple
  - $30^{\circ}\text{C}$  pour les microorganismes de l'environnement,
  - $37^{\circ}\text{C}$  pour la plupart des souches cliniques ou
  - $44^{\circ}\text{C}$  pour *Acinetobacter* pendant 48h.



Chapman : *S. aureus*



Mac Conkey : BGN



BEA : *Enterocoque*

**Interprétation** : Même méthode que pour les empreintes gélosées

- **Les résultats sont soit qualitatifs** (présence/absence) ou bien **quantitatifs** (utilisation d'un gabarit d'après la norme NF EN ISO 14698-1 (2004))
- Les critères d'interprétation doivent être définis individuellement et en équipe pluridisciplinaire pour chaque type d'échantillonnage, préalablement à la prise d'échantillons et selon la situation.

**Valeurs cibles des contrôles environnementaux**

risque	UFC/25cm <sup>2</sup>	UFC/100cm <sup>2</sup>
4	< 5	< 10
3	< 5	< 100
2	< 50	< 1000
1	< 125	> 1000

### III. Lames gélosées

**B. Lames gélosées pliantes double face avec neutralisant :** récupération par contact avec des lames gélosées double face et mise en culture des contaminants (bactéries, levures, ...).

- ✓ Cette méthode permet d'effectuer deux tests en une seule application et la recherche d'une flore totale et une flore spécifique (coliforme, entérobactérie, moisissure, levure, streptocoque et staphylocoque) en même temps.
- ✓ L'articulation du bouchon par rapport à la lame permet d'appliquer correctement la surface gélosée sur la surface à contrôler pendant 10 secondes

#### Technique par contact:

1. Application de la face A de la lame gélosée sur la surface à prélever.
2. Puis application de la surface B sur la même surface.
3. réintroduction de la lame dans son étui
4. incubation 24 à 72 H à la température optimale de chaque flore recherchée



**Flore totale**



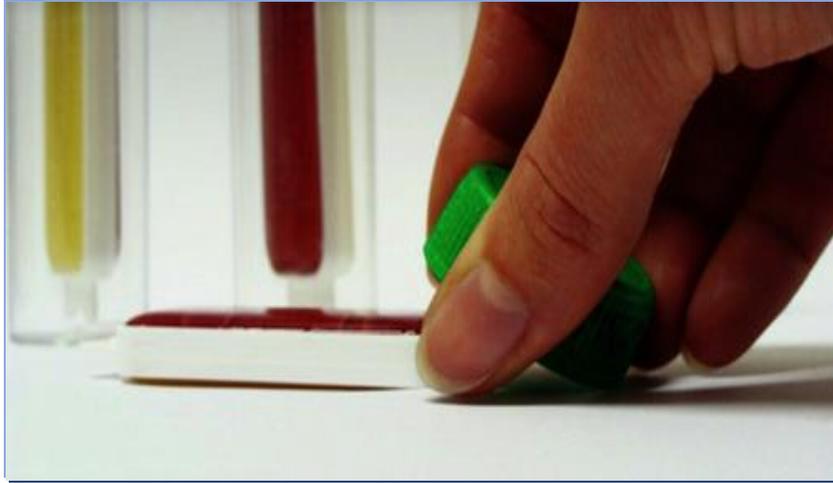
**Lame double face**

#### Technique par emersion:

1. prendre la lame par le bouchon et tremper la quelques secondes dans l'échantillon à analyser,
2. retirer la lame de l'échantillon à analyser, revisser l'ensemble sur le flacon,
3. incuber à l'étuve (photo paragraphe n°10).



**Flore spécifique :** coliforme, entérobactérie, moisissure, levure, streptocoque et staphylocoque.



**Fig : Les lames gélosées pour flore totale et flore spécifique**

### **Incubation**

Flore totale et coliforme : 30° C. à 37° C. / 24 h. ou 48 h

Pseudomonas, : 35° C. / 24 h. à 48 h.

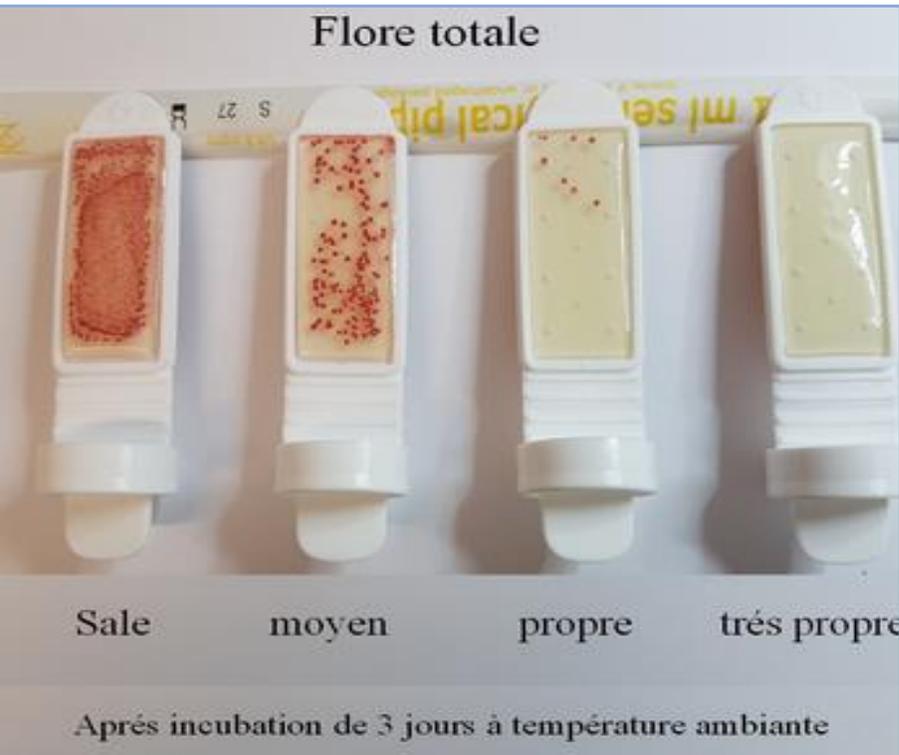
Aspergillus : 20° C. à 25° C. / 24 h. à 48 h.



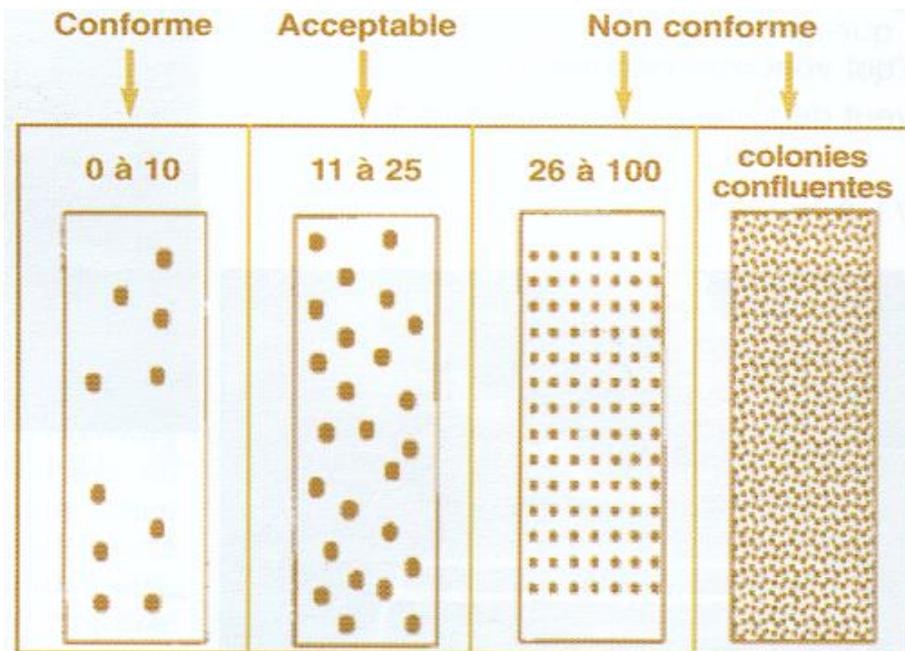
**Fig : Mini étuve spécifique lames gélosées**

# Interprétation des résultats

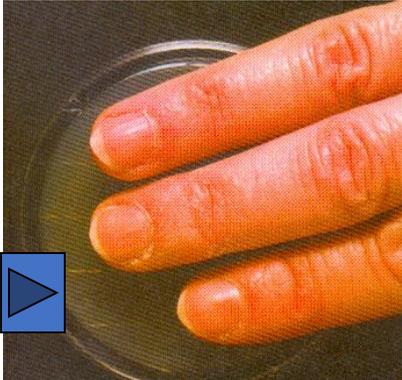
Après 24h d'incubation, le nombre de colonies qui se développent à la surface de la gélose peut être utilisé afin de quantifier la charge bactérienne et l'interprétation des résultats se fait selon la fiche d'interprétation fournie par le fabricant



Interprétation des lames gélosées après application sur une surface de travail (par comptage des UFC) :



Ce test est utilisé pour le contrôle de l'efficacité des procédures de désinfections des surfaces et du matériel, de l'hygiène des mains, l'hygiène des textiles et de la qualité microbiologique d'échantillon liquide par immersion.

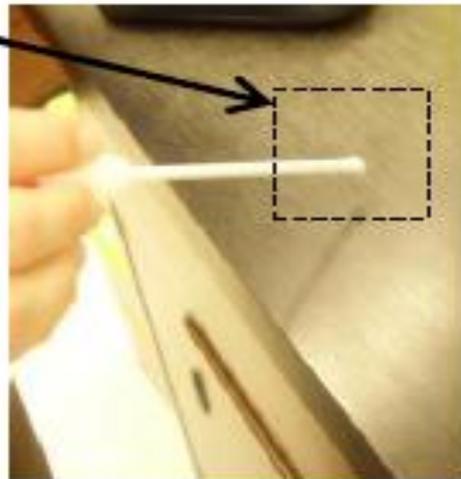


## IV. ATP-métrie

- Méthodes indirectes par l'évaluation de l'activité métabolique des microorganismes viables ou non
- Rapide et complémentaire aux méthodes d'analyse microbiologique par boîte de Pétri (48 h au minimum)
- La sensibilité et la spécificité de ce systèmes est d'environ 57 % (**ATP présente dans les cellules vivantes ou non, microbiennes ou non**)
- Mieux indiquée pour évaluer la qualité globale du bionettoyage

### Modalité de prélèvement

10 cm<sup>2</sup>



1. Frotter l'écouvillon sur la surface



2. Introduire l'écouvillon dans le luminomètre



3. Lire le résultat affiché par l'appareil

## Interprétation

- Le résultat est en unités relative de lumière (URL)
- Les seuils indiquent la non-conformité en présence d'une mesure  $> 30$  URL, cette mesure étant considérée comme la norme acceptable en industrie
- En milieu hospitalier la norme est peu applicable en raison de la complexité de l'interprétation
  - Faible contamination des surfaces
  - Détection de matériau non viable par l'ATP (liquide biologique)
  - La réaction enzymatique est influencée par la présence des détergents/désinfectants



## Contrôle de l'efficacité du bionettoyage des surfaces

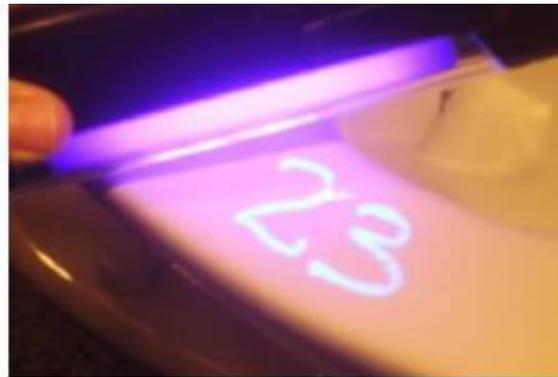
**Un gel fluorescent** : La méthode consiste essentiellement à appliquer, sur une surface, un produit qui devient fluorescent lorsqu'il est exposé à une source lumineuse à ultraviolet d'une longueur d'onde déterminée. Cette méthode peut être utilisée pour évaluer la minutie des pratiques de nettoyage. Habituellement, on vise à marquer des surfaces à contact fréquent dans l'environnement clinique.

Le produit utilisé doit être hydrosoluble, pouvoir sécher sur les surfaces tout en restant transparent et pouvoir être enlevé presque complètement après le frottage à l'aide d'un linge humide.

Le gel est appliqué afin de marquer les zones de la surface à nettoyer, mais théoriquement, il ne peut pas être vu par les membres chargés du nettoyage. Après le nettoyage, une lumière ultraviolette permet d'indiquer la quantité de gel qui a été enlevée, et par conséquent la minutie apportée au nettoyage (Figure). Ce type d'audit doit donc servir à évaluer la qualité de l'action mécanique dans la technique de nettoyage. Il n'indique pas la qualité de la désinfection car celle-ci est possible seulement en déposant le désinfectant, sans frottage.



Marquer la surface à l'aide du produit fluorescent (ex : inscrire une date)



Vérifier la surface marquée à l'aide de la lampe UV.

**Fig 24** : Marquage des surfaces par fluorescence