

Évaluation de la contamination environnementale en microbiologie Quelle stratégie adopter ?

Evaluation of the environmental contamination in microbiology Which strategy to adopt?

Eric Farfour¹
Lucie Limousin¹
Amandine Henry¹
Emilie Cardot¹
Françoise Karnycheff¹
Didier Lecointe²
Emilie Jolly¹
Marc Vasse¹
Damien Mathonnet¹

¹ Service de biologie clinique,
Hôpital Foch, Suresnes, France
<ericf6598@yahoo.fr>

² Unités fonctionnelles d'hygiène
hospitalière et de lutte contre les
infections nosocomiales, Centre
hospitalier Sud-Francilien,
Corbeil-Essonnes, France

Article reçu le 16 octobre 2018,
accepté le 12 janvier 2019

Le risque de contamination environnementale doit être maîtrisé par les laboratoires effectuant des cultures de micro-organismes. En effet, une contamination du milieu de culture peut conduire à : i) une altération de la lecture des milieux solides ou liquides. Par exemple, une contamination à champignon filamenteux est particulièrement critique puisqu'elle peut envahir en quelques jours l'ensemble d'une gélose et masquer la culture de micro-organismes à croissance lente. Un contaminant introduit dans un milieu liquide pourra devenir prédominant et masquer un micro-organisme pathogène ; ii) une attribution à tort de la symptomatologie au contaminant plutôt qu'au micro-organisme pathogène.

Tirés à part : E. Farfour

Résumé. La culture de micro-organismes expose au risque de contamination à toutes les étapes de la prise en charge du prélèvement : ensemencement, incubation, lecture des géloses. Lors de notre évaluation de renouvellement d'accréditation, un point de surveillance a été relevé quant à l'absence de prise en compte de ce risque. Sa maîtrise repose avant tout sur les opérations de nettoyages/désinfections ainsi que leur traçabilité. En complément, plusieurs stratégies basées sur la réalisation de prélèvements ou le suivi d'indicateur peuvent être mises en place. Nous proposons une analyse de risque afin de présenter ces stratégies.

Mots clés : contamination environnementale, norme ISO 17025, maîtrise de risque

Abstract. The culture of micro-organisms exposes to the risk of microbiological contamination at all stages of the analysis: inoculation on culture media, incubation, and observation of cultures. During our accreditation renewal audit, a surveillance point was notified, regarding the lack of consideration of the risk of microbiological contamination. Its mastery mainly relies on cleaning/disinfection operations and their traceability. In addition, several strategies based on environmental sampling or indicators can be performed. We propose a risk analysis in order to present these strategies.

Key words: environmental contamination, ISO 17025, risk management

Lors de notre évaluation de renouvellement d'accréditation, un point de surveillance a été relevé quant à l'absence de prise en compte du risque de contamination en microbiologie. Nous avons envisagé plusieurs stratégies à partir de notre expérience dans le secteur d'hygiène/environnement pour lequel nous sommes accrédités selon la norme NF EN ISO/CEI 17025 pour le prélèvement, la recherche et le dénombrement de légionelles dans les eaux sanitaires. En hygiène/environnement, les conditions de maîtrise sont définies dans le LAB GTA 23 révision 2 : « Il est nécessaire, selon la nature des essais, de réaliser dans la zone de travail, des contrôles appropriés de l'environnement (surface, aérobio-contamination. . .) à des fréquences prédéfinies. La fréquence et la pertinence de ces contrôles sont à établir en fonction de l'activité et de l'environnement de travail. » [1]. Ces contrôles doivent être effectués de manière périodique,

la stérilité des témoins négatifs réalisés lors de chaque série d'analyse n'étant pas suffisante : « les blancs d'analyse ne suffisent pas à assurer seuls la maîtrise des conditions ambiantes. En effet, l'obtention de blancs d'analyse non conformes peut être un signe trop tardif de la dégradation de ces conditions. Il appartient au laboratoire d'apporter la preuve de la maîtrise des risques microbiologiques induits et de l'efficacité des mesures préventives adoptées : par exemple mise en place d'un programme de nettoyage et de contrôle des surfaces, procédure de désinfection à suivre en cas de contamination accidentelle ». Ainsi, nous réalisons des prélèvements des surfaces de la paillasse et des deux étuves thermostatées à 30 °C et 36 °C. Ces contrôles sont réalisés au moins 30 minutes après nettoyage/désinfection des surfaces, à l'aide de milieux contenant des inhibiteurs de désinfectant. Des critères d'interprétations sont définis. Les résultats sont systématiquement conformes depuis la mise en place de ces contrôles.

À partir de cette expérience, nous présentons notre réflexion déclinée en 4 stratégies reposant sur la réalisation de prélèvements ou le suivi d'indicateurs. Les limites et avantages de chacune d'entre elles sont présentés dans le *tableau 1*. La réalisation et la traçabilité des opérations de nettoyage/désinfection constituent le premier moyen de maîtrise, commun aux 4 stratégies. Ces opérations sont identiques dans les secteurs d'hygiène/environnement et de biologie médicale. Les modalités et fréquences de nettoyage/désinfection sont définies dans les procédures internes, appliquées et tracées. Les surfaces des paillasses

et PSM sont nettoyées 2 fois par jour à l'aide d'un produit adapté actif sur les micro-organismes. Un nettoyage approfondi des PSM (retrait des grilles de support) et des étuves (retrait des clayettes) est réalisé 1 fois par semaine et 1 fois par mois respectivement.

Stratégie 1 Application stricte des modalités de surveillance du secteur hygiène/environnement

Dans le secteur d'hygiène/environnement, les prélèvements de surface des paillasses, étuves et postes de sécurité microbiologique (PSM) sont réalisés 5 fois par an (initialement 3 fois par an puis plus fréquemment pour donner suite à un point de surveillance relevé lors d'un audit Cofrac). L'application de cette stratégie présenterait pour principal avantage d'harmoniser les pratiques au laboratoire. En revanche, il n'existe pas de critères consensuels pour l'interprétation des résultats de prélèvement d'environnement et chaque laboratoire devra définir les siens. L'activité et le nombre d'équipements utilisés en biologie médicale étant plus importants qu'en hygiène/environnement, cette stratégie nécessiterait toutefois la réalisation de prélèvements multiples afin de contrôler l'ensemble des paillasses, PSM, et étuves.

Tableau 1. Avantages et inconvénients de chacune des stratégies de maîtrise proposée.

	Avantages	Limites
Stratégie 1 Prélèvement d'environnement	Vise à mettre en évidence une contamination objective de l'environnement Surveillance de l'ensemble des équipements	Fastidieux Absence de critères consensuels d'interprétation Reflète la qualité des procédures de nettoyages/désinfections, plus que la contamination environnementale Évaluation « un temps donné »
Stratégie 2 Prélèvement d'environnement adapté	Identique à la stratégie 1	Identique à la stratégie 1 mais moins fastidieuse
Stratégie 3 Suivi de la contamination d'un prélèvement fréquemment stérile	Permet d'évaluer l'impact d'une contamination Possibilité d'effectuer des bilans ponctuels	Fastidieux Ne distingue pas contamination lors du prélèvement ou au laboratoire Pas d'évaluation de l'ensemble des équipements/paillasse
Stratégie 4 Suivi des contaminations à champignons filamenteux	Simple de mise en place Basée sur les contaminations ayant le plus fort impact sur la lecture des milieux Évaluation de l'ensemble des équipements/paillasse Possibilité d'effectuer des bilans ponctuels	

Stratégie 2 Adaptation de la stratégie utilisée en hygiène/environnement

Cette adaptation peut se justifier à partir des 3 constats suivants :

- les résultats des prélèvements réalisés dans le secteur d'hygiène/environnement sont conformes depuis plus de 7 ans ;
- les mêmes modalités et fréquences de nettoyage sont appliquées dans le secteur de biologie médicale et d'hygiène/environnement ;
- les analyses d'hygiène/environnement ont pour objectif de mettre en évidence des micro-organismes de l'environnement, ainsi que des commensaux ou pathogènes de l'homme. En biologie médicale, ces derniers sont principalement recherchés, ce qui facilite l'identification d'un contaminant de l'environnement.

Ainsi, l'application stricte des procédures de nettoyage/désinfection associée à l'identification rapide d'une contamination d'un prélèvement nous permettent d'adapter la stratégie utilisée dans le secteur d'hygiène/environnement par une diminution de leur fréquence. On pourrait, par exemple, envisager la réalisation des prélèvements en 3 campagnes annuelles, où chaque équipement et paillasse serait contrôlé 1 fois par an *a minima*. Dans cet exemple, le nombre de prélèvements serait réduit au tiers tout en assurant un contrôle de l'ensemble des surfaces et équipements sur une année.

Caractéristiques des stratégies reposant sur la réalisation de prélèvements

Dans les stratégies précédentes, les prélèvements de surface des paillasses, étuves et PSM sont réalisées 30 minutes après les procédures de nettoyage/désinfection en utilisant des milieux contenant des inhibiteurs de désinfectants. Ainsi, ils présentent quelques limites que nous pouvons résumer ainsi :

- ces prélèvements reflètent avant tout la qualité des procédures de nettoyage/désinfection ;
- ils permettent de s'assurer de la conformité de l'environnement de travail à un temps donné, mais pas en continu ; ils ne garantissent la qualité de l'environnement qu'au moment du prélèvement.

Par ailleurs :

- les équipes en poste bénéficient d'une formation générale en hygiène ;
- les procédures de nettoyage/désinfection, simples de mise en pratique, sont présentées à chaque nouvel arrivant à un poste de travail lors de sa formation ;
- les opérations de nettoyage/désinfection des étuves et PSM sont tracés, celles des paillasses sont intégrées dans le processus de travail au poste ;

– l'ensemencement et/ou la lecture de certains échantillons sous PSM permet également de limiter le risque de contamination.

L'ensemble de ces éléments encourage à la mise en place d'alternatives.

Stratégie 3 Suivi des contaminations à partir d'un échantillon habituellement stérile

Nous proposons dans un premier temps d'évaluer un taux de contamination au laboratoire. Le taux de contamination des milieux de cultures ensemencés à partir d'un prélèvement habituellement stérile, le LCR, permettrait d'évaluer le taux de contamination au cours de l'ensemble des étapes suivies par l'échantillon, de son prélèvement jusqu'au rendu définitif des cultures. Chaque échantillon est ensemencé selon les recommandations du REMIC sur un milieu gélosé solide et un milieu liquide (lui-même repiqué en cas d'apparition d'une turbidité visible à l'œil nu) et incubé pendant 5 jours avec lecture quotidienne [2]. La prise en charge des milieux de cultures ensemencés avec un LCR suit le même processus que les autres prélèvements au laboratoire.

Matériels et méthodes

L'ensemble des LCR reçus entre le 10 juin 2018 et le 10 juillet 2018 ont été inclus. Pour chaque échantillon, le résultat de la culture (négative, positive à micro-organismes pathogènes ou contaminants) a été recueilli. La distinction entre micro-organisme pathogène et contaminant a été réalisée par le biologiste en se basant notamment sur l'identification du micro-organisme, la localisation des colonies sur les géloses, et le contexte clinique le cas échéant. En cas de contamination, le milieu incriminé, le type de contaminant (levure, bactérie, champignon filamenteux), le nombre de colonies de contaminant (pour le milieu gélosé) et le délai d'apparition de la contamination ont été recueillis. Nous avons calculé le pourcentage de contamination global, et celui de géloses envahies.

Résultats

Au cours de la période, 189 LCR ont été reçus et ensemencés (incluant ceux réalisés par ponction lombaire et sur dérivation ventriculaire externe), dont 5 ont été positifs à un micro-organisme considéré comme pathogène. En excluant les LCR positifs à pathogènes, 11 (5,9 %) milieux de culture ont montré la croissance d'un contaminant (*Propionibacterium spp*, *Corynebacterium spp* ou *Staphylococcus spp* autre que *S. aureus*, micro-organismes non identifiés) dont 3 milieux liquides et 7 milieux solides. Toutes les contaminations étaient liées à des bactéries avec une médiane de 1

[1 - 1] colonie et un délai médian d'apparition de 4 jours [3,5 - 4,5] pour les milieux solides. Aucun envahissement des géloses n'a été constaté.

Discussion

Le taux de contamination des LCR paraît faible et n'a pas d'impact sur la lecture des milieux. Elle repose sur l'analyse de deux données, le pourcentage de prélèvements contaminés et le pourcentage de prélèvements envahis. Un suivi dans le temps paraît nécessaire afin d'identifier toutes dérives et de permettre la mise en place d'actions le cas échéant.

Néanmoins, elle présente au moins trois limites la rendant peu applicable en pratique :

- elle surestime le taux réel de contamination au laboratoire puisqu'elle ne permet pas de distinguer une contamination intervenant au cours du prélèvement ou au laboratoire. Le taux global de contamination étant faible, cet impact est minime ;
- elle ne permet pas de vérifier l'ensemble des équipements utilisés au laboratoire : un seul des PSM et une seule des étuves étant utilisée pour les milieux de culture ensemencés avec des LCR, de même une seule paillasse ;
- enfin, le recueil de données est fastidieux.

Stratégie 4 Suivi des contaminations à champignons filamenteux

Les contaminations ayant le plus fort impact sur la lecture des milieux sont celles à champignons filamenteux par l'envahissement des géloses et les interférences de lecture qui en découlent. De manière générale, dès l'identification de ce type de contamination, les laboratoires renforcent immédiatement les mesures de bio-nettoyage/désinfection des équipements. Une déclaration de non-conformité permet de conserver une traçabilité de l'évènement. Celles-ci peuvent ainsi permettre la réalisation d'un bilan à échéance définie voire un suivi sous forme d'indicateur, si le laboratoire le juge pertinent. Dans cette option, un objectif devra

être défini ainsi qu'une conduite à tenir en cas de dépassement de celui-ci.

Discussion générale

La prise en compte du risque de contamination environnementale est observée par les évaluateurs Cofrac lors des évaluations sur site. Les modalités de maîtrises sont nombreuses et chaque laboratoire pourra mettre en place la stratégie la plus adaptée à son activité et son organisation. Notre réflexion nous a amenés à proposer 4 stratégies à partir de notre expérience en hygiène/environnement. Toutes reposent en premier lieu sur la réalisation exhaustive des procédures de nettoyage/désinfections et leur traçabilité et par conséquent, sur la formation des personnels. En complément, la réalisation de prélèvements permet d'objectiver l'absence de contamination de l'environnement de travail et des équipements. Néanmoins, leur réalisation habituelle dans un délai de temps bref après un nettoyage/désinfection biaise leur interprétation, ces prélèvements reflétant avant tout la qualité des procédures de nettoyage/désinfection. De plus, ils ne donnent un aperçu des conditions environnementales qu'à un temps donné, au moment du prélèvement. Le suivi du taux de contaminations et notamment de celles considérées comme les plus critiques, par exemple celles à champignons filamenteux, nous paraît la solution la plus pertinente. Elle permet d'évaluer simplement les contaminations ayant le plus fort impact, leur traçabilité permettant au laboratoire d'effectuer un suivi dans le temps.

Liens d'intérêts : les auteurs déclarent ne pas avoir de lien d'intérêt en rapport avec cet article.

Références

1. Cofrac. LAB GTA 23 Révision 2 : Guide technique d'accréditation - Analyses microbiologiques des eaux. Accessible à l'adresse : <https://www.cofrac.fr/documentation/LAB-GTA-23>. Consulté le 13/10/2018.
2. Société française de microbiologie. REMIC 6.1. Société française de microbiologie, Édition 2018, page 155.