

La méthodologie de contrôle microbiologique dans l'air et sur les surfaces (la flore microbienne de l'air)

La flore de l'air rassemble les micro-organismes de l'air qui proviennent du sol, de l'eau et les micro-organismes de l'air confiné qui sont issus des voies respiratoires de l'homme. Ces micro-organismes peuvent rester en suspension dans l'air, se déposer sur des surfaces ou être véhiculés d'un patient à l'autre.

Deux types de bactéries peuvent être retrouvés dans l'environnement :

- des bactéries d'origine environnementale (du sol, eau, plants) - la flore psychrophile (qui se développent à 15-22°C) et la flore thermophile (température optimale de croissance à 45 °C)
- des bactéries d'origine humaine et animale (flore nasale, buccopharyngée, intestinale, cutanée, vaginale) qui se développent à 35-40 °C – la flore mésophile

Les bactéries mésophiles appartiennent à l'une des trois catégories suivantes:

- Les bactéries commensales (ou saprophytes) vivent en contact étroit avec l'hôte sans provoquer de troubles décelables
- Les bactéries pathogènes entraînent des perturbations plus ou moins sévères chez l'hôte
- Les bactéries opportunistes sont normalement dépourvues de pouvoir pathogène mais elles peuvent l'acquérir chez certains hôtes fragilisés

Types de supports aux microorganismes

Les germes ne vivent que très rarement à l'état libre et leur transport aérien requiert le concours d'un support de nature variable. Ce peut être :

- **Gouttelettes de Pflügge** - proviennent du rhino-pharynx (malade et porteur sain) pulvérisées par la toux, les éternuements, la parole. Ces gouttelettes sont microscopiques, très virulents, fort nombreuses et elles peuvent se propager, à une grande vitesse, à plusieurs mètres de distance de leur point d'expulsion
- **Noyaux de condensation Wells (droplet nuclei)** : Les micro-gouttelettes se dessèchent résultant noyaux des gouttelettes (droplet-nuclei de Wells). Droplet-nuclei restent en suspension dans l'air et sont inhalés par les sujets en contact avec la source d'infection
- **Les poussières**: proviennent de la desquamation de l'épiderme et des émissions de particules, à partir du linge en particulier. Elles sédimentent rapidement

Affections transmissibles par l'air - Maladies aéroportées

- Grippe, virose respiratoires, oreillons, rubéole, rougeole, varicelle
- la diphtérie (*Corynebacterium diptheriae*) ; la légionellose (*Legionella pneumophila*) ; les méningites bactériennes septiques (nombreuses espèces dont *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium tuberculosis*, etc.) ; les pneumonies à *Mycobacterium aviae* ; la coqueluche (*Bordetella pertussis*) ; les streptococcies bêta hémolytiques du groupe A (*Streptococcus pyogenes*) : angines, scarlatine, fièvre rhumatismale, etc. ; la tuberculose (*Mycobacterium tuberculosis*).

Les indicateurs bactériologiques de l'air

Les micro-organismes indicateurs de l'hygiène des procédés peuvent être des micro-organismes pathogènes ou non.

- Nombre total de germes à 37°C/m³ d'air (NTG)
- Nombre de streptocoques alpha hémolytiques (viridans)/m³; nombre de streptocoques beta hémolytiques/m³ d'air (provenance naso-pharynx; streptocoques beta hémolytiques – pathogène)
- Nombre de staphylocoques/m³ d'air (provenance naso-pharynx, peau)
- Nombre de coliformes/m³ d'air (provenance tube digestif)
- **Recherche de *Pseudomonas aeruginosa* à faire dans les services à risque :** bloc opératoire, réanimation, maternité, oncologie et greffes (services d'immunodéprimés)

Champs d'application :

Le contrôle microbiologique de l'air est un élément indispensable à la validation des bonnes pratiques d'hygiène dans l'entreprise, notamment au contrôle d'efficacité de son plan de nettoyage-désinfection.

Les lieux concernés par ces recommandations sont tous les secteurs de soins des établissements de santé, en particulier les blocs opératoires, les secteurs à risques (réanimation, oncologie, hématologie, greffes...) et les services de stérilisation ou tout autre secteur bénéficiant d'air microbiologiquement maîtrisé (industrie alimentaire, pharmaceutique, les établissements pour les enfants).

LES PRELEVEMENTS MICROBIOLOGIQUES DE L'AIR

Les prélèvements doivent être effectués au niveau des points critiques identifiés. Ils seront effectués toujours aux mêmes endroits pour permettre d'accumuler des résultats de mesure qui pourront être comparés.

Selon les recommandations professionnelles, les prélèvements sont réalisés:

- une fois hors présence humaine avant toute activité afin d'établir une situation de base.
- en situation d'activité, de préférence dans les conditions les plus à risque.
- éventuellement après activité pour connaître l'évolution de l'aérobiocontamination (temps nécessaire pour revenir à la situation de base).

La fréquence

- une fois par trimestre, au minimum 2 fois par an
- après chaque opération nécessitant une interruption du traitement d'air (alerte incendie avec mise en jeu du système de désenfumage, maintenance des gaines ou des filtres....)

Les modalités

- l'opérateur doit être en tenue de bloc (masque, charlotte) et procédera à un lavage des mains avant tout prélèvement

- préciser le service, le local, la zone du local, la date et l'heure du prélèvement ainsi que le nom de l'opérateur
- préciser l'heure du bio-nettoyage et/ou de la désinfection par rapport au moment du prélèvement

Il existe deux modes de contrôle microbiologique de l'air :

Le mode statique (sédimentation) : il s'agit de déposer des milieux de culture gélosés (boîtes Petri) au sol ou sur une autre surface plane pendant un temps donné et de dénombrer les micro-organismes récoltés par sédimentation. Les boîtes Petri étaient incubées pendant 24 h à 37 °C. Cette méthode permet de mesurer la contamination des surfaces par les micro-organismes présents dans l'air ; le résultat n'est pas quantitatif, les flux d'air pouvant le faire varier. Il n'est pas représentatif de la contamination microbiologique de l'air, pour une raison majeure : ce sont essentiellement les particules de + de 5 microns qui sédimentent.

La formule Omelianski pour calculer le nombre de germes de l'air (prémise – sur une surface de 100 cm² exposée 5 minutes, on dépose un numero de germes égal à la numero de germes contenues dans 10 dm³ d'air).

$$N = n \times 10\,000 / S \times k$$

N – nombre de germes/m³ d'air

n – nombre de colonies sur la boîte gélosée

10 000 – le volum d'air (cm³) qui contient un numero de germes égal à la numero de germes exposées sur la surface de 100 cm²

S – la surface du boîte Petri (63,5 cm²)

k – coefficient de temp d'exposition ($k=t/5$)

Le mode dynamique (aspiration) : il s'agit de collecter les micro-organismes présents dans un volume d'air prédéfini ; des appareils de collecte d'air appelés aérobiocollecteurs permettent d'aspirer un volume d'air choisi et de récolter les micro-organismes présents sur des milieux de culture gélosés. Les prélèvements effectués permettent alors d'exprimer un taux de micro-organismes par m³ d'air et d'obtenir une cartographie microbiologique de l'air d'une zone.

La quantité d'air analysée par prélèvement ne dépasse pas 1 m³, pour éviter le dessèchement de la gélose du milieu de culture. Une fois les prélèvements effectués, les milieux de cultures peuvent être maintenus à température ambiante et doivent être acheminés au laboratoire dans les 12 heures.

Le contrôle de la qualité microbiologique de l'air est réalisé grâce à des prélèvements d'échantillons d'air à l'aide d'un biocollecteur. Différentes méthodes sont aujourd'hui disponibles pour collecter les particules biologiques aéroportées : l'impaction, la filtration et le barbotage en milieu liquide (impigement). Ces trois méthodes reposent toutes sur le principe d'aspiration de l'air, et d'impaction des particules biologiques sur un support de collecte qui peut ensuite être analysé par culture sur un milieu gélosé. La méthode d'échantillonnage utilisée majoritairement aujourd'hui est l'impaction sur gélose.

L'impaction

L'impaction permet de séparer les particules d'un flux gazeux en raison de leur inertie. Un impacteur est constitué d'un ensemble d'orifices (circulaires ou fentes), à travers lesquels passe le flux d'air aspiré, et d'une surface de collecte (généralement un milieu de culture gélosé). Les particules de taille supérieure à un certain diamètre aérodynamique vont s'impacter sur la surface de collection du fait de leur inertie, les autres continuant avec le flux d'air qui traverse l'appareil. On peut utiliser plusieurs milieux de culture différents, plus ou moins sélectifs. Après prélèvement, la boîte de Pétri est refermée et rapidement mise en étuve pour une incubation dont la température et la durée sont variables en fonction des micro-organismes recherchés.

La filtration

La collecte par filtration est utilisée pour la plupart des mesures d'aérosols microbiologiques ou non. Le principe de recueil des particules est l'interception à la surface du filtre, et non pas le simple tamisage, ce qui permet de collecter efficacement des particules de diamètre inférieur à la taille des pores du filtre (diamètre des pores variables de 0,01 à 10 microns). Le médium filtrant peut être fibreux (fibres de verre essentiellement) ou membraneux (ester de cellulose, chlorure de polyvinyle, polycarbonate). Les filtres sont placés dans des cassettes filtrantes reliées à des pompes aspirantes de faible débit. Après recueil, les filtres sont soit observés directement au microscope, soit disposés sur un milieu de culture gélosé directement, soit rincés dans un liquide stérile, lequel est ensuite dilué en série et chaque dilution ensemencée sur un milieu de culture. Après incubation, les colonies sont dénombrées et identifiées.

Le barbotage en milieu liquide

Dans ce cas, un liquide est utilisé comme milieu de recueil. L'air passe à travers le liquide par un tube capillaire destiné à réduire les dommages cellulaires, et les particules viennent barboter dans le milieu liquide. Après collecte, le liquide peut être filtré et le filtre ensemencé sur milieu gélosé, ou dilué et ensemencé comme cela a été décrit précédemment pour le liquide de rinçage des filtres.

La technologie cyclonique

En parallèle de ces techniques, une nouvelle génération d'échantillonneur d'air a été développée, basée sur la technologie cyclonique, permettant la récupération des bio-aérosols dans un échantillon liquide. Son principe consiste à aspirer l'air et les particules aéroportées à un fort débit *via* une entrée circulaire directionnelle. L'air est entraîné dans un mouvement tourbillonnant dans un cône, ce qui engendre ainsi, d'une part la centrifugation des particules sur les parois de ce cône et, d'autre part la formation d'un vortex de liquide qui va balayer ces parois. A la fin de la collecte, le liquide peut être filtré et le filtre ensemencé sur milieu gélosé, ou dilué et ensemencé comme décrit précédemment.

Le mode de prélèvement

- Placer le bio-collecteur à un mètre du sol au niveau de la zone préférentielle à prélever, fermer les portes ou le sas.
- L'opérateur devrait quitter la salle et déclencher le bio-collecteur à l'aide d'une télécommande sinon celui-ci restera immobile pendant la durée du prélèvement. Il est souhaitable que les prélèvements soient toujours effectués par la même personne
- Se munir de géloses témoins de façon à détecter des contaminations non liées au(x) prélèvement(s)
- Se munir de lingettes à usage unique et d'un pulvérisateur contenant un détergent décontaminant de façon à traiter le bio-collecteur en cas de prélèvements successifs.

Cultures, dénombrement et identification

A la fin de la collecte, les géloses Sabouraud étaient incubées pendant 24 h à 37 °C.

Résultats

Les résultats sont exprimés en nombre de CFU/m³ ("colony forming unit") de germes mésophiles.

L'étude qualitative est réalisée par identification bactériologique de toute colonie susceptible d'être incriminée dans un processus infectieux.

L'interprétation des résultats

NTG

Dans la logement – 1500 NTG/m³

Dans le milieu hospitalier

Salon – 500 NTG/m³

Zones à risque

Hors présence humaine

	Haut risque		Tres haut risque	
	Bactéries	Moisissures	Bactéries	Moisissures
Action	500	1	10	1
Alerte	100	1	5	1
Cible	10	<1	1	<1

En présence humaine :

	Bactéries	Moisissures	Bactéries	Moisissures
Cible	100	<1	10	<1

STREPTOCOQUES BETA HAEMOLITIQUES – absent

COLIFORMES - absent

Le niveau cible est le niveau de qualité qui vise à assurer et à maintenir des conditions normales de fonctionnement dans le contexte d'un environnement maîtrisé.

Le niveau d'alerte est le niveau permettant une première alerte en cas de dérive par rapport aux conditions normales. Lorsque ce seuil d'alerte est dépassé, des recherches supplémentaires doivent être mises en place, afin de vérifier les résultats observés et de s'assurer que le processus et/ou l'environnement sont toujours maîtrisés. Compte tenu des délais d'analyse, les premières mesures correctives peuvent être prises.

Le niveau d'action est le niveau devant impérativement déclencher, lorsqu'il est dépassé, une réaction immédiate avec analyse des causes du dysfonctionnement et mise en oeuvre d'actions correctives.

CONTROLE MICROBIOLOGIQUE DES SURFACES

Champ d'application

- Surfaces des zones à risque (risque 4 éventuellement 3, hors activité ou en activité)
- Surfaces des autres zones, en situation épidémique ou en situation particulier

Le plan d'échantillonnage

Etablir une liste des points critiques (points les plus salissables, les plus manipulés, les plus proches du patient). A titre indicatif - 8 points pour une salle de bloc opératoire, 5 points pour une chambre.

La fréquence

Zone à haut risque : 4 fois par an

Autre zone : fréquence à discuter

Les modalités

Préciser le secteur, le local, la date et l'heure du prélèvement ainsi que le nom du préleveur.

Indiquer s'il s'agit d'un secteur en activité ou non, la date et l'heure du nettoyage, le type de nettoyage (courant ou après sortie) et le type de produit utilisé.

Le mode de prélèvement

Par contact :

- A l'aide de Gélose contact maintenue sous une pression de 500 grammes pendant 10 secondes (à l'aide d'un applicateur ou d'un poids de 500 grammes). Après avoir réalisé le prélèvement, ne pas oublier de nettoyer la surface afin d'éliminer les traces de géloses résiduelles

Indirect (écouvillon) :

- non recommandé si on peut utiliser la méthode précédente. Cette technique est réservée aux petites surfaces ne permettant pas l'utilisation de gélose contact ou les surfaces absorbantes ou irrégulières. Écouvillonner approximativement 100 cm².

Modalités :

- Humidifier les écouvillons (eau distillée stérile, sérum physiologique, bouillon nutritif plus neutralisant, thioglycolate pour Clostridium)
- Passer l'écouvillon en stries parallèles rapprochées, en faisant tourner légèrement l'écouvillon mouillé. Répéter l'échantillonnage de la même zone par des stries perpendiculaires aux premières.

Si l'on utilise des écouvillons, les décharger dans 1 ml d'une solution neutralisante contenant au moins 3 des 4 inhibiteurs. Ensemencer 0,1 ml sur une gélose d'un milieu équivalent à celui de la boîte de contact; faire une sub-culture et ensemencer sur milieux sélectifs.

- Incuber 24 h à 37°C et relever la présence ou l'absence de germe de l'hospitalisme. Incuber à nouveau 2 jours à température ambiante de façon à dénombrer la flore totale
- Identifier les germes de l'hospitalisme par les méthodes standards.

La restitution des résultats :

Rendre les résultats en UFC/cm². Rendre l'identification des germes de l'hospitalisme accompagnée d'une appréciation quantitative.

Interprétation :

L'interprétation de la bio-contamination des surfaces doit être réalisée au regard des valeurs indicatives définies dans le tableau ci-dessous

secteurs	1	2	3	4
surfaces	< 5 UFC /cm2	< 2 UFC/cm2	< 0,2 UFC/cm2	< 0,2 UFC/cm2

Annexe : proposition de sectorisation

Secteur 1	Risques minimales : Maison de retraite, bureau ...
Secteur 2	Risques moyens : maternité, psychiatrie, service de long et moyen séjour, consultation externe...
Secteur 3	Risques sévères : Pédiatrie, soins intensifs, urgences, salles de travail, médecine, radiologie, hémodialyse, réanimation, exploration fonctionnelle, hématologie, chimiothérapie, bloc opératoire septique et obstétrical, stérilisation centrale, salles d'eau, toilettes, cuisines, biberonnerie...
Secteur 4	Très haut risques : Néonatalogie, bloc opératoire aseptique, service de brûlés, immunodéprimés, service de greffe, chimiothérapie, oncologie, onco-hématologie...

STREPTOCOQUES BETA HAEMOLITIQUES – absent
COLIFORMES - absent

La surveillance des infections nosocomiales

Seuls le recueil des informations et leur analyse permettent d'étudier les caractères épidémiologiques des infections, de proposer des actions et d'évaluer les résultats obtenus. D'autre part cette analyse et cette surveillance sont des moyens de sensibilisation des personnels.

Le choix d'une méthode

C'est la taille de l'établissement qui va guider le choix de la méthode ainsi que les moyens dont on dispose pour recueillir les informations.

L'ÉTUDE D'INCIDENCE mesure les nouveaux cas d'infection survenus, au cours d'une période donnée, chez des malades hospitalisés pendant cette même période (ce peut être calculé en semaine, en mois, en année). On étudiera, par exemple, le nombre d'infections urinaires survenues dans un service de réanimation pendant la période du 1^{er} avril au 1^{er} octobre

L'ÉTUDE DE PREVALENCE mesure les cas d'infections sur un moment ponctuel, c'est-à-dire un jour donné. Par exemple, on choisira de relever le nombre d'infections urinaires dans une unité de médecine au 8 avril.

A partir de ces données, diverses méthodes vont être utilisées à l'hôpital.

► **LA SURVEILLANCE (INCIDENCE EN CONTINU)** donne des informations qui sont parcellaires mais permanentes. Elle permet le calcul en continu du taux d'incidence. Elle sert de « clignotant » dans un service, à condition que tous les acteurs travaillent en partenariat, et

permet de déceler une épidémie. Elle est indispensable dans les services à haut risque infectieux.

► **L'ENQUÊTE D'INCIDENCE** va permettre le calcul du taux des infections sur une période plus ou moins courte. Elle va permettre d'effectuer des comparaisons entre les périodes et d'ajuster les moyens. Néanmoins, elle nécessite un suivi régulier pendant la période concernée.

► **L'ENQUÊTE DE PRÉVALENCE** est une photographie d'un jour ou d'un moment donné qui va permettre d'apprécier l'ampleur du problème infectieux. Elle va permettre le calcul du taux de prévalence. Mais elle passe souvent à côté des épidémies.

► **LA DISCUSSION DES CAS D'INFECTION** peut se faire dans le cadre de l'activité habituelle du service, mais elle entraîne une mauvaise estimation de la fréquence des infections, ainsi que bien souvent, un manque d'objectivité dans la définition du caractère nosocomial de l'infection. Elle ne permet pas le calcul de taux et nécessite des informations complémentaires pour être efficace.

Calcul des taux d'infection

Pour une population globale:

TAUX D'INCIDENCE :

$$\frac{\text{nombre d'infections}}{\text{nbre d'hospitalisés pdt période eval}} \times 100$$

TAUX DE PREVALENCE

$$\frac{\text{nombre d'infections}}{\text{nombre d'hospitalisés présents}} \times 100$$

Pour un service:

TAUX D'INCIDENCE

$$\frac{\text{nbre d'infections dans service donné}}{\text{nbre hospitalisés dans service donné}} \times 100$$

TAUX DE PREVALENCE

$$\frac{\text{nombre d'infections dans le service}}{\text{nombre de malades présents}} \times 100$$

Questions

1. Qu'est que c'est la flore mesophile?
2. Quelles sont les maladies aéroportées?
3. Décrivez les types de supports aux microorganismes
4. Décrivez les indicateurs bactériologiques de l'air
5. Quels sont les modes de prélèvement microbiologique de l'air ?

6. Précisez les normes microbiologiques pour le bloc opératoire aseptique
7. Calculez le nombre de germes dans l'air si dans la chambre il y a exposées 5 boîtes Petri avec 10, 15, 12, 15, 10 CFU/plaque
8. Calculez le taux d'incidence et de prévalence pour les infections nosocomiales dans l'Hôpital:
 - Nombre d'infections par an 250
 - Nombre hospitalisés par an 2500
 - Nombre d'infections à 1 janvier 15
 - Nombre hospitalisés à 1 janvier 300