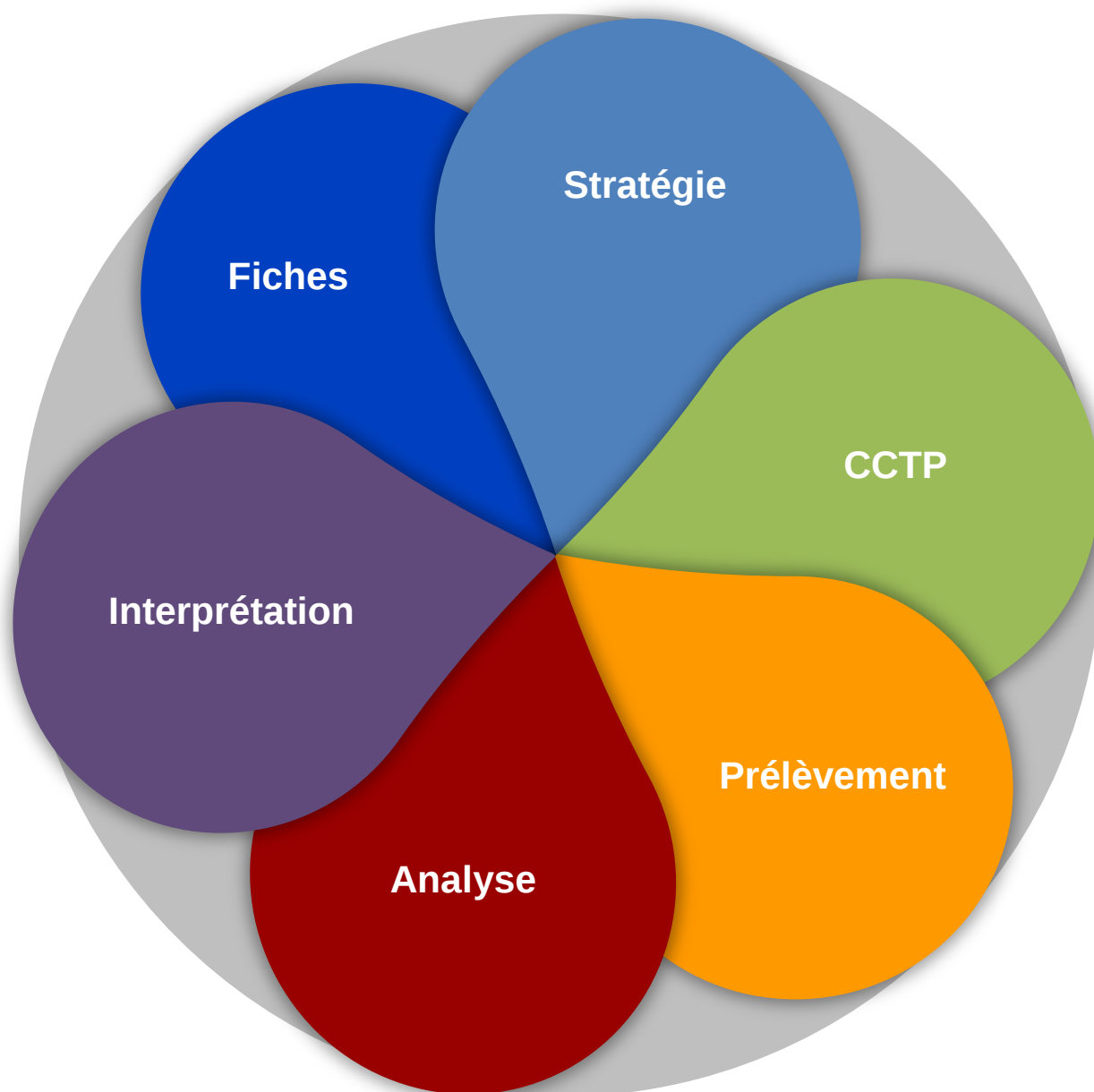


Surveillance microbiologique de l'environnement dans les établissements de santé

Guide de bonnes pratiques



Groupe de travail

Dr Boulestreau Hélène
Dr Bousseau Anne
Dr Castel Olivier
Dr Cavalié Laurent
Dr Malavaud Sandra
Dr Manton Benoit
Pr Marty Nicole
Dr Mounier Marcelle
Dr Pestourie Nathalie
Pr Rogues Anne Marie

CHU Bordeaux
CHU Poitiers
CHU Poitiers
CHU Toulouse
CHU Toulouse
CHU Toulouse
CHU Toulouse
CHU Limoges
CHU Limoges
CHU Bordeaux

Relecteurs

Dr Alloul Marmor Laure
Dr Aupée Martine
Dr Bajolet Odile
Dr Beaubeas Annette
Dr Bellon Odile
Berat Eric
Dr Bernet Claude
Dr Blanié Mathilde
Dr Cassier Pierre
Coudrais Stéphanie
Dejean Gisèle
Delamarre Valérie
Dr de Larouzière Sylvie
Dr Donnio Pierre Yves
Droguet Jérôme
Dr Flao Tanguy
Dr Grattard Florence
Dr Guet Laurence
Dr Hajjar Joseph
Dr Lawrence Christine
Dr Le Gallou Florence
Pr Lepelletier Didier
Pr Lucet Jean-Christophe
Dr Meunier Olivier
Dr Nerome Simone
Pr Ohayon Céline
Pialleport Thierry
Dr Quesnel Catherine
Pr Roques Christine
Dr Simon Loïc
Pr Traore Ousmane
Dr Verdeil Xavier

Aspec Paris
CCLIN Ouest Rennes
CHU Reims
AFS CH Paimpol
CH Brignolles
ARS Bordeaux
CCLIN Sud-Est Saint-Genis-Laval
CH Périgueux
CHU Lyon
CHU Lyon
ARS Bordeaux
CH Cayenne
CHU Clermont-Ferrand
CCLIN Ouest Rennes
CCLIN Sud-Est Saint-Genis-Laval
CHIC Marmande-Tonneins
CHU Saint-Etienne
CCLIN Paris-Nord Rouen
CH Valence
CH Garches
CHU Nantes
CHU Nantes
AP-HP Paris
CH Metz
CH Beaujon Clichy
Bordeaux
CHU Bordeaux
Bordeaux
CHU Toulouse
Hôpitaux de Brabois Vandoeuvre les Nancy
Clermont Ferrand
CHU Toulouse

Sommaire

Glossaire	6
Sigles et abréviations	10
Introduction	11
Rappel sur la démarche d'assurance qualité	13
Généralités	13
Accréditation des laboratoires d'analyses environnementales	14
Cycle de vie d'une accréditation	16
Chapitre 1 : Stratégie de la surveillance	17
Points importants	18
Questions communes à tous les contrôles environnementaux : pourquoi et qui ?	19
Stratégie pour les contrôles de l'air : Quoi, où, quand, comment ?	21
Stratégie pour les contrôles microbiologiques de l'eau : quoi, où, quand, comment ?	25
Stratégie pour les contrôles microbiologiques des surfaces : quoi, où, quand, comment ?	28
Stratégie pour les contrôles microbiologiques en endoscopie : quoi, où, quand, comment ?	31
Chapitre 2 : Eléments pour le cahier des clauses techniques particulières CCTP	35
Points importants	36
Tarifification	36
Prélèvement	37
Résultats	38
Durée du contrat	39
Synthèse des éléments spécifiques en fonction des contrôles	39
Les éléments spécifiques (figure 5)	40
Chapitre 3 : Le prélèvement	41
Prérequis	42
Air : Comptage particulaire	45
Air : Aérobiocontamination	50
Prélèvement d'eau	54
Prélèvement des surfaces	60
Prélèvement en endoscopie	64
Chapitre 4 : L'analyse - méthodes et résultats	70
Points importants	71
Choix des températures et des durées d'incubation	71
AIR : analyse - méthodes et résultats	73
Eau : analyse - méthodes et résultats	75
Surfaces : analyse - méthodes et résultats	78
Endoscopie : analyse - méthodes et résultats	81
Chapitre 5 : L'interprétation des résultats	84
Points importants	85
Air - Interprétation des résultats	86
Eau - interprétation des résultats	90
Surfaces - interprétation des résultats	92
Endoscopie - interprétation des résultats	95
Fiches pratiques	97
Fiche pratique 1 : Contrôle microbiologique de l'eau chaude sanitaire à la recherche de Legionella et Legionella pneumophila	98
Fiche pratique 2 : Contrôle microbiologique de l'eau de dialyse (de la production à l'utilisation)	99
Fiche pratique 3 : Contrôles de l'environnement au bloc opératoire hors qualification (zones à environnement maîtrisé ISO 5 à ISO 100)	100
Fiche pratique 4 : contrôles de l'environnement à la stérilisation	101
Fiche pratique 5 : Contrôles d'environnement en thérapie cellulaire (ZAC : zone à atmosphère contrôlée)	102
Fiche pratique 6 : Contrôles d'environnement à la Pharmacie à usage interne (PUI) (ZAC : zone à atmosphère contrôlée)	103
Fiche pratique 7 : Contrôle microbiologique d'un endoscope	104
Fiche pratique 8 : Contrôle microbiologique des eaux de rééducation (piscines, bains à remous, douches)	105
Annexes	106
Bibliographie	121

Table des tableaux

Tableau 1	Liens hypertextes pour accès direct par thème	12
Tableau 2	Les acteurs de la stratégie de la surveillance de l'environnement dans un établissement de santé Qui sont-ils et quel est leur rôle ?	20
Tableau 3	Stratégie des contrôles de l'eau en endoscopie	33
Tableau 4	Stratégie des contrôles des enceintes de stockage des endoscopes thermorésistants (ESET)	33
Tableau 5	Fréquences « optimales » des comptages particuliers à effectuer en salles d'opération et en chambres à environnement maîtrisé en ES	45
Tableau 6	Fréquences « optimales » des comptages particuliers à effectuer en stérilisation, pharmacie et thérapie cellulaire	46
Tableau 7	Exemples du nombre minimal de points à prélever en fonction de la surface de la salle	48
Tableau 8	Fréquences « optimale » des prélèvements d'aérobiocontamination pour les salles d'opérations et les chambres environnement maîtrisé en ES	50
Tableau 9	Fréquences « optimale » des prélèvements d'aérobiocontamination pour la stérilisation, la pharmacie et la thérapie cellulaire	50
Tableau 10	Fréquence minimale des analyses pour les paramètres microbiologiques en fonction de la typologie des différentes catégories d'eau	54
Tableau 11	Points de surveillance et fréquences minimales des recherches de Legionella dans l'eau chaude sanitaire des établissements de santé d'après l'arrêté du 1er février 2010	55
Tableau 12	Modalités de prélèvements des points du réseau en fonction de l'objectif	57
Tableau 13	Exemples de valeurs recommandées (R) et acceptables (A) pour la durée maximale de conservation d'échantillon incluant le temps de transport et les températures, sauf spécification contraire dans des normes spécifiques	58
Tableau 14	Points de prélèvements et fréquence pour l'hémodialyse conventionnelle	59
Tableau 15	Programme de contrôle microbiologique de qualification et de suivi des performances des eaux de dialyse pour la pratique de l'hémofiltration et de l'hémodiafiltration « en ligne »	59
Tableau 16	Proposition de fréquences de prélèvements de surface « au repos » en fonction du niveau de risque	60
Tableau 17	Matériel nécessaire pour un prélèvement d'endoscope sur site	65
Tableau 18	Fréquence des contrôles bactériologiques sur les eaux utilisées en endoscopie ⁽⁴⁾	67
Tableau 19	Tableau récapitulatif pour les prélèvements en endoscopie	69
Tableau 20	Principaux paramètres recherchés pour le contrôle microbiologique de l'eau	77
Tableau 21	Contrôle de l'air dans les ESET en fonction des normes	83
Tableau 22	Tableau récapitulatif des niveaux cibles recommandés en comptage particulière pour l'air dans les établissements de santé suivant la norme NF S90-351 (2013) et NF EN ISO 14644-1 ET 2 (2016)	86
Tableau 23	Tableau récapitulatif des niveaux cibles recommandés en aérobiocontamination pour l'air dans les établissements de santé par la norme NF S90-351 (avril 2013) et NF EN ISO 14698-2 (2004)	87
Tableau 24	Classification de la propreté de l'air (particulaire et microbiologique) dans les établissements de santé suivant les référentiels de la pharmacie, la stérilisation et de la thérapie cellulaire ^{(13) (16) (10) (11) (12)}	87
Tableau 25	Tableau récapitulatif des critères particuliers et microbiologiques de l'air dans les zones à environnement maîtrisé.	88
Tableau 26	Tableau récapitulatif des paramètres à contrôler lors des requalifications dans les zones à environnement maîtrisé	89
Tableau 27	Limites de qualité des eaux destinées à la consommation humaine	90
Tableau 28	Références de qualité des eaux destinées à la consommation humaine	90
Tableau 29	Principaux paramètres microbiologiques des eaux utilisées dans un ES	91
Tableau 30	Valeurs cibles en UFC/25 cm ² pour les prélèvements de surfaces par empreintes gélosées après bionettoyage	92
Tableau 31	Valeurs cibles en UFC/25 cm ² pour les prélèvements de surfaces des ZEM de la pharmacie, la thérapie cellulaire et la stérilisation « en activité » suivant les Bonnes Pratiques ^{(10)(11) (12) (13) (16)}	92
Tableau 32	Exemple d'interprétation des résultats des prélèvements de surface à la stérilisation d'après l'AFS (11) en UFC/25cm ² (UFC/boite)	93
Tableau 33	Aide à l'interprétation des résultats pour la surveillance microbiologique du processus de traitement des endoscopes ⁽³⁾	95
Tableau 34	Résultats des contrôles de l'air dans les ESET en fonction des normes	96
Tableau 35	Principes de fonctionnement des différents types d'échantillonneurs par impaction	1089
Tableau 36	Table pour la classification ISO en fonction de la taille des particules	110

Table des figures

Figure 1	Représentation schématique du processus des contrôles microbiologiques (les 3 « R »)	12
Figure 2	Roue de Deming	13
Figure 3	Diagramme d'Ishikawa	13
Figure 4	Représentation schématique du cycle de vie d'une accréditation	16
Figure 5	Eléments spécifiques en fonction des contrôles	40
Figure 6	Eléments de la fiche de prélèvement	43
Figure 7	Exemples de position du préleveur quand il ne peut pas sortir de la salle dans une chambre en environnement maîtrisé	47
Figure 8	Exemples de position du préleveur quand il ne peut pas sortir de la salle dans une salle d'opération et exemple de positionnement des points de prélèvements lors des contrôles de routine suivant la norme NF S 90-351 (2013)	47
Figure 9	Exemple de localisation des 10 points de prélèvements choisis pour une salle ISO 7 de chirurgie viscérale de 38 m ² suivant la norme NF EN ISO 14644-1 et 2 (2016)	49
Figure 10	Illustration d'un prélèvement d'air par impaction. (2 modèles de biocollecteurs)	52
Figure 11	Représentation schématique des points pouvant être inclus dans un plan d'échantillonnage « en routine »	53
Figure 12	Représentation schématique des points pouvant être inclus dans un plan d'échantillonnage pour une requalification	53
Figure 13	Exemples de boîtes préparées pour le transport	53
Figure 14	Illustrations de prélèvements d'eau (robinet, douche)	56
Figure 15	Schéma du prélèvement d'eau en piscine	57
Figure 16	Photo du « profil convexe » d'une boîte contact non ensemencée	61
Figure 17	Méthodes de prélèvements de surface par boîte contact	62
Figure 18	Exemples d'écouvillons pour prélèvements de surface	63
Figure 19	Représentation schématique d'un prélèvement de surface par écouvillonnage	63
Figure 20	Illustration d'un prélèvement global d'endoscope	66
Figure 21	Boîte contact après incubation	79
Figure 22	Exemple de localisation des 10 points de prélèvements choisis pour une salle ISO 7 de chirurgie viscérale de 38 m ² suivant la norme NF EN ISO 14644-1 et 2 (2016)	111
Figure 23	Représentation schématique du déroulement des qualifications d'après la norme NF S90-351 (2013)	114

Tableau 1 : Liens hypertextes par thème

GENERALITES (communes aux 4 thèmes)	Chapitre 1 Stratégie (p 17)	Chapitre 3 Prélèvement (p 41)	Chapitre 4 Analyse (p 720)	Chapitre 5 Interprétation (p 84)
AIR	Stratégie (p 21)	Prélèvement CP (p 45) Aerobio (p 50)	Analyse (p 73)	Interprétation (p 86)
EAU	Stratégie (p 25)	Prélèvement (p 54)	Analyse (p 75)	Interprétation (p 90)
SURFACES	Stratégie (p 28)	Prélèvement (p 60)	Analyse (p 78)	Interprétation (p 92)
ENDOSCOPES	Stratégie (p 31)	Prélèvement (p 64)	Analyse (p 81)	Interprétation (p 95)

Accréditation : attestation délivrée par une tierce partie, ayant rapport à un organisme d'évaluation de la conformité, constituant une reconnaissance formelle de la compétence de ce dernier à réaliser des activités spécifiques d'évaluation de la conformité.

Agents biologiques : micro-organismes, y compris les micro-organismes obtenus par ingénierie génétique, culture de cellules et endoparasites, pathogènes ou non (sans préjudice des dispositions de l'article R. 4421-2 du code du travail).

Agents biologiques pathogènes : agents biologiques susceptibles de provoquer une infection, une allergie ou une toxicité ou de constituer de toute autre façon un risque pour la santé humaine (sans préjudice des dispositions de l'article R. 4421-4 du code du travail).

Biocontamination : contamination d'une matière, d'un appareil, d'un individu, d'une surface, d'un liquide, d'un gaz ou de l'air par des particules viables.

Biofilm : toute surface au contact d'un fluide peut être contaminée plus ou moins rapidement par des substances organiques, inorganiques ou par des particules biologiques incluant des micro-organismes, créant ainsi de véritables écosystèmes appelés « biofilms ». Ces communautés organisées sont enrobées d'une matrice de polymères organiques qui contient des polysaccharides, des phospholipides, des acides téichoïques et même des acides nucléiques, voire aussi dans certains cas des minéraux et des résidus sanguins.

Cahier de route : les équipements des salles dédiées aux activités techniques (SDAT), de laboratoires importants ou essentiels doivent être accompagnés d'un « cahier de route » mentionnant, selon le cas, tous les étalonnages, les validations, les opérations d'entretien, de nettoyage ou de réparation, avec les dates et le nom des personnes ayant effectué ces opérations.

Certification : attestation réalisée par une tierce partie relative à des produits, des processus, des systèmes ou des personnes.

Cinétique d'élimination des particules : temps exprimé en minutes nécessaire pour éliminer 90 % des particules de diamètre supérieur ou égal à une valeur donnée par rapport au pic de pollution initiale, dans un volume déterminé hors présence humaine (en général le diamètre choisi est 0,5 µm, on parle de CP_{0,5}).

Classe de risque infectieux : graduation de 1 à 4 du niveau de risque du plus faible au plus élevé estimé après analyses du risque infectieux (risque 1 = minime, risque 2 = moyen, risque 3 = haut, risque 4 = très haut).

Conformité : satisfaction d'une exigence.

Contrat : convention par laquelle une ou plusieurs personnes s'obligent, envers une ou plusieurs autres, à donner, à faire ou à ne pas faire quelque chose.

Contrôle microbiologique : prélèvement (échantillonnage) + analyse et résultat validés.

Echantillon : une ou plusieurs parties prélevées sur un système en vue de fournir des informations sur ce système, souvent pour servir de base à la décision concernant ce système ou sa production.

Echantillon d'eau : volume global d'eau représentatif de l'eau à contrôler, prélevé dans un endroit défini suivant des modalités définies et destiné à la réalisation d'analyses. En pratique, l'échantillon prélevé peut correspondre à un ou à plusieurs flacons conditionnés suivant des modalités définies en fonction des analyses à réaliser.

- **Premier jet** : écoulement direct au moment de l'ouverture du point d'eau ;
- **Rinçage** : écoulement de l'eau 30 secondes (ex : après désinfection des dispositifs accessoires : aérateurs, brise jet, pommeaux de douche...) ;
- **Deuxième jet** : écoulement de l'eau après purge (1 à 3 minutes).

Echantillonnage : procédure définie par laquelle une partie d'une substance, matériau ou produit est prélevée pour fournir, à des fins d'essai, un échantillon représentatif de la totalité. (NF EN ISO/CEI 17025 (2005)).

Echantillonneur par impaction : dispositif destiné à prélever des particules dans l'air ou dans d'autres gaz par impact avec une surface solide.

Echantillonneur par piégeage : dispositif destiné à prélever des particules dans l'air ou dans d'autres gaz par impact avec une surface liquide.

Environnement maîtrisé : zone définie où l'on maîtrise les sources de contamination à l'aide de moyens spécifiés.

Erreur systématique : composante de l'erreur de mesure qui, dans des mesurages répétés, demeure constante ou varie de façon prévisible.

Exactitude de mesure : étroitesse de l'accord entre une valeur mesurée et une valeur vraie d'un mesurande.

Exigence : besoin ou attente formulés, habituellement implicites, ou imposés.

Famille d'endoscopes : ensemble d'endoscopes dont les caractéristiques sont identiques (nombre de canaux, diamètre des canaux, architecture interne de l'endoscope...).

Fiche de prélèvement : document renseigné par le préleveur pour assurer la traçabilité complète des conditions de prélèvement et celle des mesures *in situ* et faire le lien avec l'identification du prélèvement.

Fidélité de mesure : étroitesse de l'accord entre les valeurs mesurées obtenues par des mesurages répétés du même objet dans des conditions spécifiées.

Flambage : action consistant à porter le matériau d'un point de prélèvement à une température élevée à l'aide d'une flamme afin d'assurer sa désinfection.

Flore monomorphe : présence d'un seul type de colonie (mono-microbien).

Flore polymorphe : présence de deux ou plusieurs types de colonies (pluri-microbiens).

Flux d'air non unidirectionnel : régime de distribution d'air où l'air soufflé dans la zone propre se mélange à l'air déjà présent au moyen de l'induction.

Flux d'air unidirectionnel : flux d'air maîtrisé traversant l'ensemble d'un plan de coupe d'une zone propre, possédant une vitesse régulière et des filets à peu près parallèles.

Habilitation : autorisation d'exécuter des tâches, des actions.

Habilité : personne possédant les qualifications requises, les compétences nécessaires et reconnues par son responsable fonctionnel pour accomplir les tâches qui lui sont confiées.

Incertitude : paramètre non négatif qui caractérise la dispersion des valeurs attribuées à un mesurande, à partir des informations utilisées.

Incertitude de mesure : paramètre, associé au résultat d'un mesurage, qui caractérise la dispersion des valeurs qui pourraient raisonnablement être attribuées au mesurande.

Incertitude-type : incertitude de mesure exprimée sous la forme d'un écart-type.

Installation après construction : installation complète avec toutes les servitudes connectées et en fonctionnement, mais sans équipement ni matières de production et sans personnel présent.

Installation au repos : installation complète, avec l'équipement (le matériel) de production installé et fonctionnant comme convenu entre le client et le fournisseur, mais sans personnel présent (exemple : dans le cadre d'une ZEM, l'installation est considérée au repos après une durée correspondant à 3 CP_{0,5}).

Installation en activité : installation fonctionnant selon le mode prescrit, avec l'effectif spécifié travaillant dans les conditions convenues.

Justesse de mesure : étroitesse de l'accord entre la moyenne d'un nombre infini de valeurs mesurées répétées et une valeur de référence.

Liste de travail : liste éditée chaque jour au laboratoire qui regroupe les analyses à effectuer.

Mesurande : terme de métrologie désignant la grandeur que l'on souhaite mesurer.

Micro-organisme : toute entité microbiologique, cellulaire ou non cellulaire, capable de se reproduire ou de transférer du matériel génétique.

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

Niveau d'alerte : 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.

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

Non-conformité : non-satisfaction d'une exigence.

Norme : ensemble de spécifications décrivant un objet, un être ou une manière d'opérer. Il en résulte un principe servant de règle et de référence technique. Une norme est d'application volontaire sauf si elle est rendue « d'application obligatoire » par un texte réglementaire ou décret de loi.

Prélèvement ou action de prélever : action de « prendre » une partie de l'objet de départ, pour aboutir à l'échantillon dont la propriété caractéristique est sa représentativité de l'objet de départ. (NF EN ISO/CEI 17025 (2005)).

Prélèvement microbiologique : prélèvement et conditionnement d'un échantillon pour la réalisation d'analyses microbiologiques et/ou biologiques.

Processus : ensemble d'activités corrélées ou interactives qui transforme des éléments d'entrée en éléments de sortie.

Purge (sous-tirage) : action d'évacuer l'eau de la tubulure proximale du point d'eau pour éliminer l'eau stagnante qui s'y trouve.

Qualification d'installation : opération composée d'une série systématique de contrôles, de réglages, de mesurages et d'essais devant être effectuée, en vue de vérifier la conformité de chaque élément et étape de l'installation réalisée, selon les exigences du cahier des charges et des documents (NF S90-351 (2013)).

Qualification opérationnelle ou fonctionnelle : processus d'obtention de preuves documentées selon lesquelles l'équipement installé fonctionne dans les limites prédéterminées, dans la mesure où il est utilisé conformément à son mode opératoire. (série d'essais et de mesurages devant être effectuée en vue de vérifier que tous les éléments de l'installation fonctionnent ensemble pour atteindre les conditions requises dans l'état d'occupation « après construction » ou « au repos », les équipements dédiés à l'activité étant présents et sous tension (NF S90-351 (2013)).

Rapport d'essai : compte rendu des résultats accompagnés de toutes les informations demandées par le client et nécessaires à l'interprétation des résultats de l'essai, ainsi que de toutes les informations exigées par la méthode utilisée. (NF EN ISO/CEI 17025 (2005)).

Rendement : le rendement d'une culture correspond à la valeur obtenue/la valeur réelle de contamination. Il dépend de la force appliquée, du milieu de culture, de l'analyse et de la relation surface/micro-organismes (support, humidité, matières organiques...).

Répétabilité de mesure : fidélité de mesure selon un ensemble de conditions de répétabilité (conditions de mesurage qui comprennent la même procédure de mesure, les mêmes opérateurs, le même système de mesure, les mêmes conditions de fonctionnement et le même lieu ainsi que des mesurages répétés sur le même objet dans un court laps de temps).

Reproductibilité de mesure : fidélité de mesure selon un ensemble de conditions de reproductibilité (conditions de mesurage qui comprennent des lieux, de opérateurs et de systèmes de mesure différents, ainsi que des mesurages répétés sur le même objet ou des objets similaires).

Reproductibilité intra-laboratoire : fidélité intermédiaire de mesure incluant uniquement les variations au sein d'un seul laboratoire.

Requalification : accomplissement de la série d'essais spécifiée pour l'installation, afin de démontrer sa conformité à la classe spécifiée (norme NF EN ISO 14644-1 (1999)), comprenant la vérification des conditions préalables exigées pour les essais (pour vérifier que les paramètres obtenus lors de la qualification initiale sont reproduits dans le temps : conditions d'essai et périodicité définies).

Risque : le risque est défini comme la combinaison de la probabilité d'occurrence d'un événement redouté (par exemple l'infection associée aux soins) et de la gravité de ses conséquences sur une cible donnée (par exemple le patient), (NF S90-351 (2013)).

Salle propre : salle dans laquelle la concentration en particules en suspension dans l'air est maîtrisée et qui est construite et utilisée de façon à minimiser l'introduction, la production et la rétention des particules à l'intérieur de la pièce, et dans laquelle d'autres paramètres pertinents, tels que la température, l'humidité et la pression sont maîtrisés comme il convient.

Sous-traitant : entité chargée par un donneur d'ordres et suivant ses directives, de la fabrication des produits, de la prestation de services ou de l'exécution des travaux qui sont destinés à être fournis au donneur d'ordres ou exécutés pour son compte.

Surveillance microbiologique d'un établissement de santé : évaluation des populations de base des écosystèmes dans le but de participer à la prévention des infections et d'améliorer l'hygiène.

Unité viable : une ou plusieurs particules viables, que l'on dénombre comme une seule unité (Unité Formant Colonie ou UFC).

Validation (NF EN ISO 9000 (2005)) : confirmation par des preuves tangibles que les exigences pour une utilisation spécifique ou une application prévue ont été satisfaites.

Viable cultivable : micro-organisme capable de se développer sur un milieu de culture adapté.

Viable non cultivable (*Viable But Non Culturable*) : micro-organisme capable de générer une contamination mais non cultivable par les techniques standard de microbiologie. Les VBNC ont généré de nombreuses technologies « sans culture » basées pour la plupart sur la spectrométrie et la PCR en temps réel.

Zone propre : espace dédié dans lequel la concentration en particules en suspension dans l'air est maîtrisée et qui est construit et utilisé de façon à minimiser l'introduction, la production et la rétention des particules à l'intérieur de la pièce, et dans laquelle d'autres paramètres pertinents, tels que la température, l'humidité et la pression sont maîtrisés comme il convient. Cet espace peut être clos ou ouvert, et peut être situé à l'intérieur d'une salle propre.

SIGLES ET ABREVIATIONS

AFAQ : association française pour l'amélioration et le management de la qualité.

AFNOR : association française de normalisation.

AFS : association française de stérilisation.

AGLAE : association générale des laboratoires d'analyse de l'environnement.

AMDEC : analyse des modes de défaillance, de leurs effets et de leur criticité.

ANSES : agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail.

ARS : agence régionale de santé.

ASPEC : association pour la prévention et l'étude de la contamination.

BIPEA : bureau interprofessionnel des études analytiques.

BPF : bonnes pratiques de fabrication.

BPPH : bonnes pratiques de pharmacie hospitalière.

BVQI : *bureau veritas quality international*.

CAT : conduite à tenir.

CCTP : cahier des clauses techniques particulières (cahier des charges).

CEI : commission électrotechnique internationale.

CEN : comité européen de normalisation.

CLIN : comité de lutte contre les infections nosocomiales (terme générique pour instance consultative de lutte contre les infections nosocomiales).

CME : commission médicale d'établissement.

COFRAC : comité français d'accréditation.

CP : classe particulière.

CTA : centrale de traitement d'air.

CTIN/ CTINILS : comité technique des infections nosocomiales/ comité technique des infections nosocomiales et des infections liées aux soins.

DD : détergent-désinfectant.

DM : dispositif médical.

DNP : diluant neutralisant Pharmacopée.

EBM : eau bactériologiquement maîtrisée.

ECS : eau chaude sanitaire.

EIG : événement indésirable grave.

EN : *european normalisation*.

EOH : équipe opérationnelle d'hygiène.

EPP : évaluation des pratiques professionnelles.

ERV : enterocoque résistant à la vancomycine.

ES : établissement de santé.

ESET : enceinte de stockage des endoscopes thermosensibles.

ESS : eau pour soin standard.

FAR : flore aérobie revivable.

FHA : friction hydroalcoolique des mains.

GBEA : guide de bonne exécution des analyses de biologie médicale.

HACCP : *hazard analysis critical control point*.

IAES : infection associée à l'environnement de soins.

IAS : infection associée aux soins.

IRDEAF : installation de refroidissement par dispersion d'eau dans un flux d'air.

ISO : *international organization for standardization*.

LBM : laboratoire de biologie médicale.

LDE : laveur désinfecteur des endoscopes.

LSC : limite supérieure de confiance.

MAQ : manuel assurance qualité.

MO : micro-organisme.

NF : norme française.

NPP : nombre le plus probable.

PCA : *plate count agar*.

PCR : *polymerase chain reaction*.

PSM : *poste de sécurité microbiologique*.

PUI : pharmacie à usage interne.

RABC : *risk analysis biocontamination control system*.

SCHS : service communal d'hygiène et de santé.

SF2H : société française d'hygiène hospitalière.

SHA : solution hydroalcoolique.

SMM : salles microbiologiquement maîtrisées.

TAR : tour aéroréfrigérantes.

TIAC : toxi infection alimentaire collective.

TSA : trypto-caséine soja.

UFC : unité formant colonie.

UU : usage unique.

UV : unité viable.

VBNC : *viable but non culturable*.

VRBL : *violet red bile lactose agar*.

ZAC : zone à atmosphère contrôlée.

ZCC : zone à contamination contrôlée.

ZEC : zone à environnement ou empoussièrément contrôlé.

ZEM : zone à environnement maîtrisé.

INTRODUCTION

Dans les établissements de santé, le risque microbiologique lié à l'environnement doit être pris en compte car il est potentiellement pourvoyeur d'infections associées aux soins (IAS) sous la forme d'infections associées à l'environnement de soins (IAES).

Les contrôles microbiologiques d'environnement (prélèvement + analyse et résultats validés) participent à la prévention des infections en :

- identifiant les risques potentiels grâce à la connaissance de l'écologie environnementale de l'établissement,
- analysant les risques en fonction de l'écologie, des zones concernées, des activités et des personnes exposées,
- prenant les mesures adaptées au regard des résultats des contrôles effectués (maintenance, modifications des installations...).

Ils permettent aussi :

- de suivre une démarche qualité en tant qu'indicateurs à condition qu'ils soient judicieusement choisis et constants, au moins pendant une même campagne de surveillance pour établir un historique ;
- d'adapter les points de contrôles en fonction des résultats obtenus pour une meilleure pertinence de la surveillance.

Ceci implique :

- une bonne connaissance de l'établissement (systèmes de traitement d'air, réseaux d'eaux sanitaires, zones à risque,...) et une analyse de risque qui prend en compte les sources de dangers (contraintes architecturales, pertinence des matériaux, défauts de conception, de réalisation, de maintenance, réalisation de travaux, comportement des utilisateurs,...) mais également les modes d'exposition (contact, air, gouttelettes...) sans oublier les risques liés aux patients eux-mêmes (immunodéprimés, brûlés,...) ;
- des objectifs précis pour chaque prélèvement ou campagne de prélèvements ;
- une méthodologie rigoureuse et standardisée depuis les modalités de prélèvement et techniques d'analyse jusqu'à l'interprétation des résultats. A noter que certains prélèvements sont réglementaires et, dans ce cas, ils doivent impérativement être conduits dans le respect du texte en vigueur ;
- une anticipation de l'interprétation des résultats (idéalement lors de la réflexion sur la stratégie de mise en place).

Le guide national sur ce sujet est déjà ancien ⁽¹⁾ de même que celui du CCLIN Sud-Ouest ⁽²⁾. Il nous a paru utile de produire un nouveau guide que nous avons conçu avec des chapitres indépendants en vue :

- **d'apporter une aide pratique « de terrain »** pour :
 - le « prescripteur » : équipe opérationnelle d'hygiène (EOH) et/ou CLIN¹ (stratégie de la surveillance, éléments cahier des clauses techniques particulières, et interprétation des résultats) par délégation du Directeur de l'établissement de santé (ES),
 - l'« exécutant » (le prestataire) : laboratoire (prélèvements, analyses, validation des résultats...),
- **d'actualiser les connaissances** car, au cours de ces dernières années, les techniques analytiques se sont améliorées, la qualité s'est développée et la réglementation et/ou les recommandations (légionelles; endoscopes...) ont évolué ;
- **d'encourager l'harmonisation** dans la pratique de cette surveillance microbiologique, quel que soit le secteur concerné, pour améliorer la compréhension entre les différents partenaires et intervenants. A titre d'exemple, afin d'harmoniser le vocabulaire, nous avons choisi le terme « générique » de « zone à environnement maîtrisé » ou ZEM comme proposé dans la norme NF S90-351(2013) en conservant les autres appellations uniquement quand elles sont mentionnées telles quelles dans des normes ou réglementations spécifiques².

¹ CLIN : le comité de lutte contre les infections nosocomiales est supprimé depuis le décret n° 2010-439 du 30 avril 2010 relatif à la commission médicale d'établissement dans les établissements publics de santé qui confie à la CME « la gestion globale et coordonnée des risques visant à lutter contre les infections associées aux soins », mais le sigle, largement passé dans le langage courant, a été conservé dans ce guide.

² La terminologie utilisée est extrêmement variée pour qualifier les zones à contamination maîtrisée : salles blanches, salles propres, salles « stériles », salles microbiologiquement maîtrisées (SMM), zones à contamination contrôlée (ZCC), zones à atmosphère contrôlée (ZAC), zones à environnement ou empoussièrisme contrôlé (ZEC)...

Le champ de ce document concerne **la surveillance microbiologique de l'air, de l'eau, des surfaces et des endoscopes**. Le comptage particulaire ne fait pas partie de la surveillance microbiologique *stricto sensu* mais c'est un complément intéressant du contrôle microbiologique de l'air qui permet de dénombrer les particules inertes (viables et non viables) de l'environnement : c'est à ce titre qu'il est inclus dans ce document.

La conduite à tenir en cas de résultats non conformes est exclue du champ du document car elle doit être adaptée à chaque situation et graduée en fonction du risque évalué.

Le schéma du processus des contrôles microbiologiques (figure 1) définit les principaux chapitres du document et propose un accès direct au chapitre par le lien hypertexte associé. Les liens hypertextes du tableau 1 permettent un accès « transversal » par thème (air, eau, surfaces, endoscopes). Ce tableau est répété à la fin des principaux paragraphes.

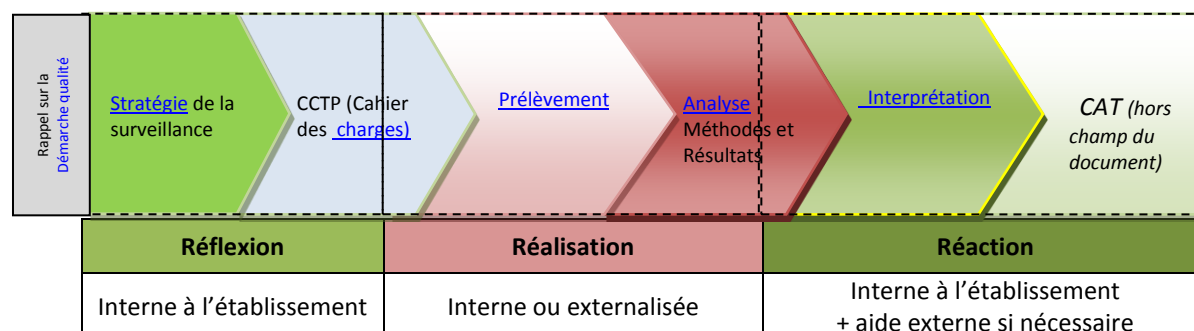


Figure 1 : Représentation schématique du processus des contrôles microbiologiques (les 3 « R »)

Tableau 1 : Liens hypertextes par thème				
GENERALITES (communes aux 4 thèmes)	Chapitre 1 Stratégie (p 17)	Chapitre 3 Prélèvement (p 41)	Chapitre 4 Analyse (p 720)	Chapitre 5 Interprétation (p 84)
AIR	Stratégie (p 21)	Prélèvement CP (p 45) Aerobio (p 50)	Analyse (p 73)	Interprétation (p 86)
EAU	Stratégie (p 25)	Prélèvement (p 54)	Analyse (p 75)	Interprétation (p 90)
SURFACES	Stratégie (p 28)	Prélèvement (p 60)	Analyse (p 78)	Interprétation (p 92)
ENDOSCOPES	Stratégie (p 31)	Prélèvement (p 64)	Analyse (p 81)	Interprétation (p 95)

RAPPEL SUR LA DEMARCHE D'ASSURANCE QUALITE

Généralités

La démarche d'assurance qualité occupe actuellement une place importante dans les laboratoires effectuant des analyses de biologie médicale et/ou environnementales. Elle est apparue initialement dans le monde industriel aux USA afin d'organiser le travail et d'améliorer la qualité des produits fabriqués. Elle a ensuite connu un essor important au Japon lors de la ré-industrialisation du pays après-guerre.

Origine du concept

Les grands concepteurs sont les professeurs William Edwards Deming (1900-1993) et Kaoru Ishikawa (1915-1989).

Pour Deming, la mise en œuvre du management de la qualité se décline en quatre parties PDCA (figure 2) qui correspondent à :

1. **Plan** : définir les exigences de la demande afin de mettre en œuvre des processus de réalisation adaptés.
2. **Do** : réaliser précisément les processus prédéfinis.
3. **Check** : surveiller et contrôler la réalisation afin de garantir la conformité du produit.
4. **Act** : agir, prendre des mesures en cas de dérive afin de les corriger ou de les arrêter.

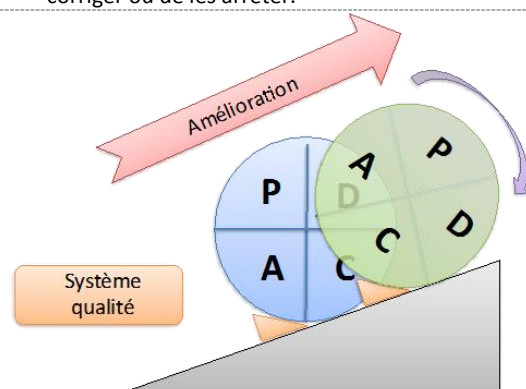


Figure 2 : Roue de Deming

L'approche d'Ishikawa correspond à l'analyse des causes en utilisant le diagramme des causes à effets ou règle des 5 M (figure 3 et annexe 1) :

1. **Matière** : matériaux utilisés durant les processus.
2. **Matériel** : équipements disponibles et nécessaires.
3. **Méthode** : mode opératoire à suivre.
4. **Main-d'œuvre** : personnel disponible.
5. **Milieu** : environnement dans lequel se réalise le processus.

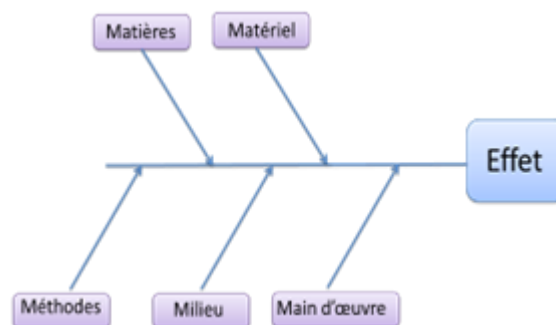


Figure 3 : Diagramme d'Ishikawa
(ou « diagramme en arêtes de poisson »)

Le système actuel

Le système de la qualité est décrit sur le plan mondial à travers les normes ISO (International Standardization Organisation), regroupant plus de 150 pays. Actuellement quatre normes principales sont en vigueur :

- NF EN ISO 9000 (2005) Systèmes de management de la qualité - Principes essentiels et vocabulaire,
- NF EN ISO 9001 (2008) Systèmes de management de la qualité,
- NF EN ISO 9004 (2009) Gestion des performances durables d'un organisme - Approches de management par la qualité,
- NF EN ISO 9011 (2011) Lignes directrices pour l'audit des systèmes de management.

Les normes ISO sont reprises :

- au niveau européen par les normes CEN (Comité Européen de Normalisation) créées pour harmoniser les différentes normes des états membres,
- au niveau national par l'AFNOR (Association Française de Normalisation).

Différents organismes (ex : COFRAC, BVQI...) réalisent à la demande du client des audits et délivrent ou renouvellent un certificat de conformité aux exigences (label qualité, gage du bon respect des normes en vigueur).

Certification, accréditation et agrément

La certification suivant les normes ISO est une garantie de l'amélioration continue du système qualité. L'accréditation assure en plus le respect des règles déontologiques et des règles de l'art internationalement acceptées (impartialité, indépendance, compétence). Ainsi, en plus de la conformité du système qualité, l'accréditation reconnaît la compétence des personnels du site concerné. Elle nécessite le recours à des évaluateurs qualitatifs et à des experts techniques (www.cofrac.fr).

Pour les laboratoires demandant l'accréditation, les normes à respecter sont :

- pour la biologie médicale (LBM) :
 - la norme NF EN ISO 15189 (2012) Laboratoires de biologie médicale - Exigences concernant la qualité et la compétence - Laboratoires d'analyses de biologie médicale ;
 - la norme NF EN ISO 22870 (2006) - Analyses de biologie délocalisées (ADBD) - Exigences concernant la qualité et la compétence ;
- pour les prélèvements et les analyses environnementales : la norme NF EN ISO/CEI 17025 (2005) Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais.

Ces documents décrivent l'ensemble des prescriptions relatives au management (système qualité, maîtrise documentaire, sous-traitances...) et aux techniques (personnel, méthodes et validations de méthodes, équipement...).

Accréditation des laboratoires d'analyses environnementales

À ce jour, pour les contrôles environnementaux, **l'accréditation est obligatoire seulement pour le contrôle sanitaire de l'eau destinée à la consommation humaine et pour la recherche de légionelles dans l'eau chaude sanitaire (ECS) :**

Pour le contrôle sanitaire des eaux destinées à la consommation humaine, à l'exclusion des eaux minérales naturelles et des eaux de piscines et de baignades (baignades aménagées et autres baignades), **l'accréditation** est le préalable à **l'agrément** suivant l'arrêté du 24 janvier 2005 relatif aux conditions d'agrément des laboratoires pour la réalisation des prélèvements et des analyses du contrôle sanitaire des eaux qui fixe les conditions administratives et techniques dans lesquelles les laboratoires peuvent obtenir un agrément pour la réalisation des prélèvements ou des analyses des paramètres du contrôle sanitaire (<http://www.sante.gouv.fr/laboratoires-agrees-pour-le-contrôle-sanitaire-des-eaux.html>) et qui précise que « L'agrément est subordonné à une accréditation préalable selon la norme ISO/CEI 17025 ... ».

Pour la recherche de légionelles, l'arrêté du 1^{er} février 2010 relatif à la surveillance des légionelles dans les installations de production, de stockage et de distribution d'eau chaude sanitaire stipule que « le responsable des installations fait réaliser les prélèvements d'eau et analyses de légionelles par un laboratoire accrédité pour le paramètre légionelles par le Comité français d'accréditation ou tout autre organisme d'accréditation équivalent européen signataire de l'accord multilatéral pris dans le cadre de la coordination européenne des organismes d'accréditation ». La technique est imposée et doit suivre la norme d'application obligatoire³ (actuellement NF T90-431 (2014)).

Toutes les étapes du processus pré-analytique, analytique et post-analytique doivent permettre d'assurer la fiabilité du résultat rendu en tenant compte des incertitudes de mesure dues à l'influence du milieu, la main d'œuvre, les matières, le matériel et les méthodes(ex : règle des 5M, AMDEC...).

Etape pré-analytique : le prélèvement

La maîtrise de l'étape pré-analytique (prélèvement d'échantillon) est importante pour la validité d'une analyse. Elle peut entrer dans le cadre d'une accréditation COFRAC ou organisme d'accréditation équivalent européen (ex : eau destinée à la consommation humaine, légionelles).

³ L'application obligatoire d'une norme est caractérisée par la référence à la norme dans un texte réglementaire comme moyen unique de satisfaire aux exigences du texte.

Pour cette étape, les points critiques concernent, entre autres :

- **Le préleveur** : Ses compétences sont essentielles et doivent être décrites dans une fiche de poste. Lors d'un recrutement, une formation interne assure l'habilitation initiale (théorique et pratique). Celle-ci correspond à une évaluation théorique (connaissances des différentes normes et textes réglementaires, procédures internes, modes opératoires) et pratique (réalisation de prélèvements de façon conforme aux directives). Cette habilitation peut aussi être réalisée par validation de l'expérience pour une personne réalisant cette tâche depuis plusieurs années. Le maintien de l'habilitation du personnel est à réaliser annuellement. Il est basé sur des critères qualitatifs et quantitatifs (minimum de réalisations des prélèvements). L'ensemble des étapes d'habilitation doit être tracé ;
- **Le plan de prélèvement** : Il doit être connu de façon précise avec un descriptif de chaque point et le préleveur doit pouvoir en apprécier la pertinence ;
- **Les écarts** : Ceux observés entre le plan de prélèvements et le « terrain » doivent être tracés et diffusés aux personnes concernées afin de les corriger (ex : point non prélevable car non accessible, absence de point de puisage...) ;
- **Le matériel nécessaire aux prélèvements** : Il doit être répertorié et contrôlé de même que le consommable ;
- **La traçabilité** : Une fiche de prélèvement doit accompagner le ou les échantillons.

La mise en œuvre de la démarche qualité varie en fonction du type de prélèvement :

- pour les prélèvements d'eau : la démarche qualité est la plus avancée du fait de l'existence de plusieurs réglementations (arrêtés du 1^{er} Février 2010, du 24 février 2005 et du 12 février 2007) et normes : FD T90-522 (2006), FD T90-520 (2005), NF EN ISO 19458 (2006), NF EN ISO 5667-1 (2007), NF EN ISO 5667-3 (2013) ;
- pour les prélèvements d'air et de surfaces, il n'y a pas actuellement de réglementation :
 - pour les contrôles d'air par comptage particulaire : la norme ISO/DIS 14644-1 (2014) décrit la méthode à employer ainsi que l'exploitation statistique des résultats,
 - pour les prélèvements microbiologiques d'air et de surfaces : les indications des normes sont moins précises. La norme NF EN ISO 14698 (2004) parties 1 et 2 ainsi que la norme spécifique aux établissements de santé NF S90-351(2013) apportent des éléments ;
- pour les prélèvements en endoscopie : en l'absence de réglementation, les guides «Eléments d'assurance qualité en hygiène relatifs au contrôle microbiologique des endoscopes et à la traçabilité en endoscopie »⁽³⁾, « guide pour l'utilisation des laveurs désinfecteurs d'endoscopes »⁽⁴⁾ et « Enceintes de stockage d'endoscopes thermosensibles (ESET) »⁽⁵⁾ sont actuellement utilisés comme référentiels.

Etape analytique

Cette étape peut être réalisée en suivant :

- une norme imposée dans le cadre de contrôles réglementaires (application obligatoire pour les laboratoires agréés ou accrédités pour ces paramètres),
- une norme choisie comme référentiel,
- une procédure technique validée en interne.

L'accréditation d'un laboratoire d'analyse environnementale pour tout ou partie de ses analyses, en plus de la norme NF EN ISO/CEI 17025 (2005), implique, entre autres, l'obligation de répondre à différents points relatifs aux documents de référence. Pour l'eau, le COFRAC propose différents guides techniques complémentaires, qui sont d'ordre général (LAB REF 02, LAB GTA 23, LAB GTA 19, LAB-REF-05...) ou spécifiques (LAB GTA 29).

Concernant l'analyse des prélèvements d'air et de surface, il n'existe pas à ce jour de guides techniques d'accréditation mais des documents normatifs sont disponibles (normes NF EN ISO 14644-1 et 2 (2016), NF EN ISO 14698 (2004), NF S90-351 (2013), ainsi que des guides (ASPEC⁽⁶⁾, SF2H⁽⁷⁾).

Dans tous les cas et pour assurer la fiabilité des résultats, la démarche qualité lors de cette étape demande :

- la réalisation :
 - de témoins positifs, de témoins négatifs,
 - de contrôles inter-laboratoires (ex : AGLAE, BIPEA ...),
 - de contrôles internes : validation des milieux (stérilité, fertilité) et des réactifs (spécificité), validation du matériel (cartographie des étuves, des bains-marie...),
- l'habilitation et le maintien des compétences de la personne,
- l'évaluation des incertitudes de mesure,
- la gestion des non-conformités (création de fiches d'écarts, description des mesures correctives et évaluations),
- la réalisation d'audits internes,
- le contrôle de la fiabilité du système informatique.

Etape post analytique

L'étape post analytique concerne la validation, les résultats et l'archivage. Cette partie est moins développée dans la norme NF EN ISO/CEI 17025 (2005) que dans la NF EN ISO 15189 (2012).

La démarche qualité permet de garantir la fiabilité des analyses réalisées et la qualité de la prestation offerte par le laboratoire car elle implique la maîtrise de toutes les étapes du pré-analytique au post-analytique et limite les erreurs.

Cycle de vie d'une accréditation d'un laboratoire d'analyses environnementales

Le plan de surveillance de l'accréditation est défini par le COFRAC dans le document LAB-REF-05. L'accréditation initiale est donnée pour un ou des paramètre(s) spécifié(s) pour une période de 4 ans, la première évaluation de surveillance sur site est réalisée dans les 12 mois. Par la suite, l'accréditation est délivrée pour une période de 5 ans avec des visites de contrôle tous les 15 mois (figure 4).

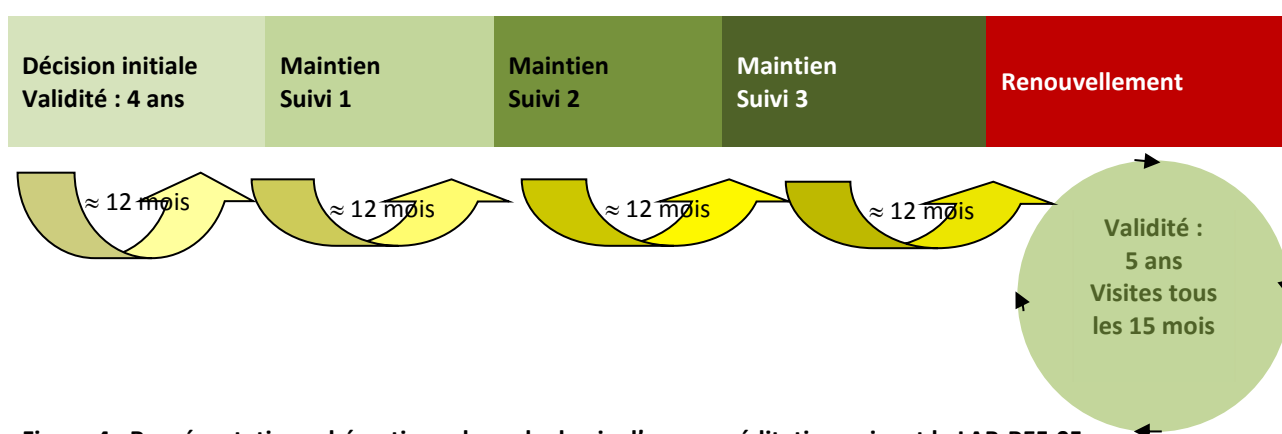


Figure 4 : Représentation schématique du cycle de vie d'une accréditation suivant le LAB-REF-05

Tableau 1 : Liens hypertextes par thème				
GENERALITES (communes aux 4 thèmes)	Chapitre 1 Stratégie (p 17)	Chapitre 3 Prélèvement (p 41)	Chapitre 4 Analyse (p 720)	Chapitre 5 Interprétation (p 84)
AIR	Stratégie (p 21)	Prélèvement CP (p 45) Aerobio (p 50)	Analyse (p 73)	Interprétation (p 86)
EAU	Stratégie (p 25)	Prélèvement (p 54)	Analyse (p 75)	Interprétation (p 90)
SURFACES	Stratégie (p 28)	Prélèvement (p 60)	Analyse (p 78)	Interprétation (p 92)
ENDOSCOPES	Stratégie (p 31)	Prélèvement (p 64)	Analyse (p 81)	Interprétation (p 95)

Chapitre 1

Stratégie de la surveillance

Points importants

Avant toute mise en place de contrôles environnementaux, il **est indispensable de réfléchir à une stratégie de surveillance adaptée à l'établissement de santé**. Cette réflexion est capitale pour contenir le budget alloué à cette surveillance tout en ayant des données exploitables et utiles pour participer de manière efficiente à la protection des personnes (patients, personnels, visiteurs...). L'aspect économique qui prend en compte le coût des contrôles, l'achat de la documentation⁴ (normes...) et, si besoin, le financement de la démarche d'accréditation doit être mis en parallèle avec le fait que la surveillance est un outil additionnel à la prévention des infections et qu'elle peut donc participer à la réduction des coûts afférents aux infections nosocomiales.

La stratégie de la surveillance microbiologique environnementale sera :

- réfléchie pour répondre au besoin réel de l'établissement en se basant notamment sur la connaissance et/ou attribution d'une classe de risque infectieux de chaque zone de l'ES en fonction de l'analyse de risque préalable et des recommandations des sociétés savantes⁵,
- conçue depuis la nécessité des contrôles jusqu'à la conduite à tenir (CAT) en cas de résultats non-conformes,
- intégrée dans la démarche qualité de l'établissement de santé et incluse dans sa démarche de certification,
- coordonnée et validée par l'EOH et/ou le CLIN.

A ce jour, les contrôles environnementaux sont réglementés (obligatoires) seulement pour la potabilité de l'eau de consommation humaine et pour la recherche de légionelles dans l'ECS.

Hors mention spécifique, les normes ne sont pas d'application obligatoire mais elles peuvent être utiles pour la mise en œuvre de la surveillance.

Les outils pour conduire la réflexion

La réflexion est propre à chaque établissement en fonction des patients qu'il accueille, des soins effectués, de l'architecture et bien sûr du budget. En aide à cette réflexion, les outils « classiques » de la qualité peuvent se combiner.

A titre d'exemple :

- la réflexion générale peut être conduite sur un schéma de questionnaire type « QQQCP » (quoi, qui, où, quand, comment, pourquoi) ;
- la détermination des points critiques⁶ peut être réalisée sur les schémas de l'analyse de risque *a priori* (recherche des points critiques et de leur maîtrise type HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point), AMDEC (Analyse des Modes de Défaillance, de leurs Effets et de leur Criticité), RABC (Risk Analysis Biocontamination Control system), cartographie des risques...

Pour compléter la réflexion, il faut, dès cette étape :

- établir un plan d'échantillonnage,
- définir pour chaque paramètre retenu les niveaux seuils de maîtrise (cible, alerte, action),
- penser à établir une ligne conductrice de conduite à tenir (CAT) et d'analyse de causes :
 - dans le cas où le seuil d'alerte est dépassé de façon répétitive,
 - et dans le cas où le seuil d'action est atteint ou dépassé.

La CAT, dépendante de l'évènement et de l'établissement, ne sera pas abordée dans ce document.

⁴ La documentation évolue, les normes sont régulièrement révisées : il est donc important d'assurer une bonne gestion documentaire pour actualiser la documentation.

⁵ Le guide du bionettoyage (Commission centrale des marchés – GPEM / SL – Recommandation n° E-1-90. Direction des Journaux officiels, 1994) a classé les locaux en 4 zones suivant le risque infectieux encouru par les personnes soignées (risque 1 = minime, risque 2 = moyen, risque 3 = haut, risque 4 = très haut) ; La norme NF S90-531 (2013) propose des exemples de classe de risque en fonction des types d'activité identifiés dans les ES et des valeurs guides pour mettre en relation chaque classe de risque avec les performances particulières, microbiologiques et aérodynamiques d'une salle.

⁶ Point critique : point le plus exposé à une contamination et qui peut faire l'objet d'une intervention afin d'éliminer les risques ou bien de les réduire à un niveau acceptable de leur occurrence.

Les limites de la surveillance microbiologique

La stratégie de surveillance microbiologique doit prendre en compte les limites inhérentes :

1. **A l'environnement** : C'est un milieu fluctuant et hétérogène qui génère des écosystèmes complexes avec des micro-organismes dans des états physiologiques très hétérogènes, de ce fait, il n'y a pas de « mesure absolue » :
 - le dénombrement au sein d'un échantillon est influencé par la population des germes viables « stressés » qui seront cultivables ou non en fonction du milieu et des conditions de culture (température, durée d'incubation, atmosphère) ;
 - les micro-organismes (MO) sont « attachés » aux surfaces sous forme de biofilm⁷ relargué de manière aléatoire... Ainsi, le rendement de la culture correspond à la valeur obtenue / la valeur réelle de contamination. À titre d'exemple, pour les surfaces prélevées par empreinte gélosée, le rendement dépend de la force appliquée, de la relation surface / micro-organismes (support, humidité, matières organiques...) du milieu de culture et de l'analyse⁽⁸⁾.
2. **Aux résultats** : Ils sont dépendants des techniques de culture qui ne détectent que les particules viables et cultivables sur le milieu utilisé (ne mettent pas en évidence tous les MO présents). **Il est donc important de bien fixer les objectifs des contrôles et, dans le cadre de recherches ciblées**, de bien préciser le micro-organisme recherché (mycobactéries atypiques, parasites ...) car il peut être nécessaire d'utiliser des méthodes spécifiques, adaptées à cette recherche ;
La comparaison de résultats entre eux est souvent complexe voire impossible si les méthodes utilisées sont différentes ou si les prélèvements sont peu fréquents car les contrôles donnent une image instantanée qui reflète l'état à un instant « T ».
3. **A la reproductibilité** : Pour l'optimiser, il est indispensable d'exiger des procédures rigoureuses depuis le prélèvement jusqu'au rendu des résultats (méthodes, milieux, conditions de culture, expression des résultats....).

Remarque : Quand la réglementation donne des techniques ou méthodes de référence, il est indispensable de suivre strictement la procédure indiquée par le texte car la notion de conformité des résultats en dépend sauf à valider une technique alternative.

Les limites impliquent aussi de prendre en compte que :

- à l'exception du comptage particulaire⁸, les résultats sont différés (délai plus ou moins long en fonction des normes, conditions de culture...) ;
- les contrôles microbiologiques ne sont pas des certificats de conformité ou de bonne conscience ;
- les contrôles ne dispensent en aucun cas de la vigilance quotidienne de la pratique (aspect visuel, check list, alarmes ou témoins machine) et des EPP (évaluation des pratiques professionnelles, audit de pratiques,).

Les contrôles microbiologiques, si et seulement si, ils sont effectués de manière fiable permettent d'avoir un historique des résultats des points surveillés. L'interprétation des résultats peut alors être un indicateur quant au processus (dysfonctionnement, défaut de prise en charge...) et, hors obligation réglementaire, une base argumentaire pour faire évoluer la stratégie de surveillance notamment en termes de choix des points et de fréquence de prélèvements.

Questions communes à tous les contrôles environnementaux : pourquoi et qui ?

Pourquoi réaliser des contrôles dans le cadre d'une surveillance environnementale ?

Cette question « pourquoi a-t-on décidé de mettre en place ces contrôles ? » doit permettre de définir des objectifs clairs qui peuvent être :

- connaître l'écosystème de l'établissement et surveiller la présence de MO pour participer à la prévention des infections associées à l'environnement de soins,
- répondre à une obligation réglementaire,
- suivre des indicateurs dans le cadre d'une démarche d'assurance qualité,
- surveiller les zones à environnement maîtrisé,

⁷ Biofilm : collection de micro-organismes (vivants ou morts) et de leurs produits extra-cellulaires liés à une surface solide (vivante ou inanimée).

⁸ Contrôles particuliers : ne sont pas des contrôles microbiologiques « *stricto sensu* » car ils dénombrent des particules (viables ou non) mais sont une méthode efficace et rapide pour vérifier le bon fonctionnement d'un système de traitement d'air. Les résultats ne sont en aucun cas superposables ou prédictifs de l'aérobiocontamination.

- surveiller et prévenir les risques liés aux travaux et/ou aux opérations de maintenance,
- valider une méthode ou un processus (qualifications),
- s'inscrire dans une enquête épidémiologique orientant vers une source environnementale,
- visualiser la contamination environnementale dans le cadre d'une démarche pédagogique. (pour sensibiliser le personnel à l'hygiène environnementale et faciliter la mise en place de mesure corrective...).

A titre d'exemple, pour les ZEM, les normes NF EN ISO14698 (2004) ou NF S90-351 (2013) précisent que ces prélèvements sont à réaliser :

- lors de dépassements consécutifs des niveaux d'alerte ou d'action,
- après l'arrêt prolongé des activités,
- lors de la détection d'agents infectieux dans les zones à risque,
- après toute opération importante de maintenance,
- après des modifications du procédé ayant un effet sur l'environnement de la salle propre,
- après l'enregistrement de résultats inhabituels,
- après des modifications des procédures de nettoyage et de désinfection,
- après des événements inopinés pouvant contribuer à la biocontamination.

Qui sont les acteurs ?

Cette question aura pour objet de désigner en amont qui sont les partenaires et intervenants de cette surveillance et quel est leur rôle : le tableau 2 aide à y répondre.

Tableau 2 : Les acteurs de la stratégie de la surveillance de l'environnement dans un établissement de santé : Qui sont-ils et quel est leur rôle ?		
Acteurs pour	Qui	Pourquoi
Le domaine de responsabilité	EOH	▪ Apporter son expertise pour proposer la stratégie (après consultation si besoin des services techniques, biomédical...)
	CLIN	▪ Valider le programme
	Direction de l'établissement	▪ Prendre la responsabilité de la décision
L'identification du risque	EOH et/ou CLIN	▪ Respecter la réglementation et les recommandations ▪ Prévenir les risques infectieux (environnement, patients, personnels, soins) ▪ Evaluer les risques avec les professionnels concernés ▪ Valider et prioriser les risques si besoin
La réalisation du contrôle	Prestataires externes ou internes (laboratoire)	▪ Respecter la réglementation et les recommandations ▪ Respecter le cahier des charges ▪ Organiser la prestation ▪ Valider et transmettre les résultats
La gestion des résultats validés	EOH	▪ Interpréter les résultats ▪ Détecter d'éventuelles anomalies et /ou incidents ▪ Alerter ▪ Proposer les actions à mettre en œuvre ▪ Suivre les mesures correctives
La mise en œuvre de la CAT * (si résultats non conformes)	Les acteurs sont à définir en fonction de l'événement et de l'ES	▪ Assurer l'efficacité des décisions prises

* CAT hors champ de ce guide

Stratégie pour les contrôles de l'air : Quoi, où, quand, comment ?

Préambule

Il n'y a pas de texte réglementaire spécifiques pour la surveillance de l'air, seulement des normes d'application non obligatoire (NF S90-351 (2013), NF EN ISO 14644-1 et 2 (2016), NF EN ISO 14698 (2004)), et des recommandations de sociétés savantes (guide ASPEC ⁽⁶⁾ « la biocontamination – salles propres, environnements maîtrisés et zones de confinement », guides SF2H « Qualité de l'air au bloc opératoire et autres secteurs interventionnels » ⁽⁷⁾ et « Risque infectieux fongique et travaux en établissement de santé » ⁽⁹⁾). Les établissements ont la possibilité de reprendre les objectifs de qualité d'air des normes ou des objectifs différents qu'ils définissent eux-mêmes et qu'ils sont à même de justifier (par exemple, diminuer les valeurs maximum des classes microbiologiques, viser la classe ISO 6 pour certains locaux...).

Hors contexte particulier (épidémies, recherches fongiques), les contrôles d'air se justifient uniquement dans des zones à environnement maîtrisé (ZEM) et s'échelonnent tout le long de la vie de ces zones sous la forme de :

- **Qualification opérationnelle (QO)** (ou fonctionnelle) : processus effectué lors de la mise en service de la ZEM qui permet d'assurer qu'elle est capable de satisfaire aux exigences spécifiées.

Les mesures sont effectuées après 48 h de fonctionnement, hors présence humaine, locaux totalement équipés et portes fermées et comportent (norme NF S90351 (2013)) : la classification particulière, la classification microbiologique, la cinétique d'élimination des particules, la classification microbiologique des surfaces, la vérification des paramètres aérauliques de la zone (vitesses de déplacement d'air des flux d'air entrant, débits d'air de soufflage, de reprise et d'extraction, taux de brassage horaire, taux d'air neuf, visualisation des flux d'air (identification des zones mortes et vérification de la laminarité des flux unidirectionnels), la vérification des pressions différentielles (gradient ou cascade de pressions), la vérification de la température et éventuellement de l'hygrométrie (% HR).

- **Requalification périodique** : La requalification intervient afin de démontrer la conformité aux exigences requises selon la classe spécifiée et comprend la vérification des conditions préalables exigées pour les essais.

La norme NF S90-351 (2013) préconise une périodicité annuelle et après tout changement susceptible d'impacter les conditions environnementales (travaux, changement de filtre terminal...). Les essais effectués en requalification sont effectués « au repos » et sont identiques à ceux réalisés en QO.

- **Surveillance des performances** : elle permet de « démontrer un fonctionnement satisfaisant, en dehors des phases de requalification et/ou de qualification. Cela se traduit par un programme de mesurages défini et justifié, qui peut permettre de suivre, le cas échéant, les performances d'une installation en activité et de déterminer le maintien de la conformité sur des points critiques » (NF 90-351 (2013)). Il s'agit d'une surveillance des paramètres physiques de la ZEM qui pour certains sont suivis en continu (différentiel de pression, perte de charge des filtres...). Des contrôles particuliers peuvent également être effectués au cours de certains processus notamment dans l'industrie pharmaceutique (comptage particulière en continu).
- **Contrôles d'environnement en routine** : « L'analyse environnementale, qualitative et/ou quantitative, correspond à l'analyse d'échantillons d'origine environnementale. Cette recherche de contaminants chimiques et/ou biologiques a pour objectif de vérifier l'efficacité des processus de maîtrise de la qualité de l'environnement, d'optimiser les procédures, de suivre les points critiques de maîtrise et de dresser un historique des contaminations » (NF S90-351 2013)). Ces contrôles sont effectués au repos après bionettoyage.

Dans ce document, les contrôles de l'air seront limités à l'aérobiocontamination et aux comptages particuliers en gardant à l'esprit que les autres paramètres sont également surveillés et que, en cas de résultats non conformes, tous les paramètres sont pris en compte pour élaborer une conduite à tenir avec les acteurs concernés (ingénieur et services techniques en charge de la maintenance des centrales de traitement d'air et des ZEM, service de soins concernés...).

Quoi ?

Dans la cadre de ces contrôles, on recherche des micro-organismes et/ou particules inertes en suspension dans l'air.

Aérobiocontamination	Comptage particulaire
Recherche de bactéries, levures et champignons filamenteux Pour - S'assurer que les classes microbiologiques sont conformes aux valeurs attendues ; - Suivre des indicateurs de résultats (démarche qualité) ; - Localiser des sources de contamination ; - Effectuer des recherche(s) spécifique(s) ; - Participer à la qualification (opérationnelle ou requalification) les zones à environnement maîtrisé (ZEM) ; - Permettre, lors des travaux, de s'assurer de l'isolation correcte du chantier et de la remise à niveau quand les travaux sont terminés.	Recherche de particules inertes (viables et non viables) Pour - S'assurer que les classes particulières sont conformes aux valeurs attendues ; - Suivre des indicateurs de résultats (démarche qualité) ; - Participer à la qualification (opérationnelle ou requalification) les zones à environnement maîtrisé (ZEM) ; - Permettre, lors des travaux (ZEM), de s'assurer de l'isolation correcte du chantier et de la remise à niveau quand les travaux sont terminés.

Remarque : Lors de travaux exposant à un risque de contamination fongique les prélèvements d'aérobiocontamination sont effectués.

1. pendant les travaux : dans les zones adjacentes au chantier (voire des zones à risques définies lors de l'étude d'impact) ;
2. à la fin des travaux : au niveau du chantier si une contamination fongique résiduelle représente un risque pour les patients.

Où ?

Les points à surveiller prioritairement sont préalablement définis par une analyse de risque et reportés sur le plan des locaux (plan d'échantillonnage).

Aérobiocontamination	Comptage particulaire
Hors contexte épidémique, les points de prélèvements sont situés : - dans des zones à environnement maîtrisé (ZEM)⁹ : classe de contamination particulières (ISO) inférieure ou égale à ISO 8 (ex : conditionnement stérilisation, salle d'opération, salle blanche....) ; - dans des zones ou situations exposant des patients à risque fongique (hématologie, ...) ; - les lieux et points de prélèvements peuvent être déterminés à l'aide des normes (ex : NF S90-351(2013) pour les ES). Pour - Cibler les « points critiques »¹⁰ car ce sont ceux qui, après analyse des risques, exposent le plus les patients ou les produits et/ou ceux qui représentent les points « indicateurs » d'éventuelles défaillances (ex : zone de croisement des flux, zone à ventilation défaillante) ; - Effectuer un suivi comparatif à condition de conserver les mêmes points de prélèvements au cours d'une même campagne de contrôles et, réaliser les prélèvements avec la même méthodologie (reproductibilité) ; - Vérifier l'absence de champignons qui est un bon indicateur de maîtrise environnementale : ▪ les points de prélèvements pour la recherche d'<i>Aspergillus</i> ou de champignons filamenteux (air + surfaces) sont réalisés dans les zones à risque fongiques comme les services hébergeant des patients réceptifs à un risque fongique (neutropéniques, greffés...) ou la stérilisation (conditionnement et/ou sortie stérile...) ; ▪ en contexte de travaux, les lieux et points de prélèvements sont planifiés en fonction d'une analyse de risques.	Les points de prélèvements sont situés : - dans des zones à environnement maîtrisé (ZEM) : classe de contamination particulières (ISO) inférieure ou égale à ISO 8 (ex : conditionnement stérilisation, salle d'opération, salle blanche....) ; - les lieux et points de prélèvements peuvent être déterminés à l'aide des normes NF EN ISO 14644-1 et 2 (2016), NF S90-351 (2013). Pour - Cibler les « points critiques » car ce sont ceux qui représentent les points « indicateurs » d'éventuelles défaillances (ex : zone de croisement des flux, zone à ventilation défaillante...) ; - Effectuer un suivi comparatif à condition de conserver les mêmes points de prélèvements pendant une même campagne de contrôles et de réaliser les prélèvements avec la même méthodologie (reproductibilité).

L'historique des résultats permet de modifier, avec un argumentaire adapté, le plan d'échantillonnage qui ne doit pas rester figé dans le temps mais être évolutif en fonction des résultats, des modifications de procédures... Les points toujours « bons » ne sont finalement pas critiques et peuvent être retirés du plan d'échantillonnage pour permettre d'inclure d'autres points pour tester leur criticité.

⁹ La norme NF EN ISO 14698-1 définit un « environnement maîtrisé » comme étant une zone définie où l'on maîtrise les sources de contamination à l'aide de moyens spécifiés.

¹⁰ Point critique : point le plus exposé à une contamination et qui peut faire l'objet d'une intervention afin d'éliminer les risques ou bien de les réduire à un niveau acceptable de leur occurrence.

Quand ?

Aérobiocontamination	Comptage particulaire
Le moment du contrôle doit être compatible avec l'activité de la zone contrôlée et il est défini dès le cahier des charges. Classiquement, le contrôle est réalisé hors activité sauf pour la pharmacie à usage interne, la stérilisation et la thérapie cellulaire où les référentiels ^{(10) (11), (12)} prévoient des valeurs cibles également en activité. Remarque : Il arrive aussi que dans certaines ZEM la présence de patients, voire de personnel, soit quasi constante (réanimation, chambres d'hématologie,...). Dans ce cas, des contrôles d'air peuvent avoir lieu en présence humaine, le préleveur demandant que l'activité soit minimale et le mentionnant dans son rapport de résultats. L'interprétation devra être réfléchie et adaptée au risque évalué. Pour mémoire : Les prélèvements se font de préférence après bionettoyage en respectant un temps de repos minimum de 3 CP_{0,5}¹¹ (ou d'environ 1 heure si la CP_{0,5} n'est pas connue avec précision). Pour - Faciliter l'interprétation des résultats en utilisant des moments similaires pour les prélèvements (mêmes horaires, même fréquence...),	

Tableau 1 : Liens hypertextes par thème				
GENERALITES (communes aux 4 thèmes)	Chapitre 1 Stratégie (p 17)	Chapitre 3 Prélèvement (p 41)	Chapitre 4 Analyse (p 720)	Chapitre 5 Interprétation (p 84)
AIR	Stratégie (p 21)	Prélèvement CP (p 45) Aerobio (p 50)	Analyse (p 73)	Interprétation (p 86)
EAU	Stratégie (p 25)	Prélèvement (p 54)	Analyse (p 75)	Interprétation (p 90)
SURFACES	Stratégie (p 28)	Prélèvement (p 60)	Analyse (p 78)	Interprétation (p 92)
ENDOSCOPES	Stratégie (p 31)	Prélèvement (p 64)	Analyse (p 81)	Interprétation (p 95)

¹¹ CP_{0,5} : Classe de cinétique d'élimination des particules, particules ≥ 0,5 µm.

Comment ?

Les méthodes d'échantillonnage et les procédures associées doivent être choisies en fonction des objectifs fixés.

Aérobiocontamination	Comptage particulaire
Objectif : Dénombrement des micro-organismes cultivables à l'aide d'un aérobiocollecteur en cours de validité (annexe 2). Méthode : L'air étant un milieu fluctuant et hétérogène, un prélèvement unique est insuffisant, c'est pourquoi, en routine, les prélèvements sont adaptés en fonction du contexte et des résultats obtenus en concertation avec l'EOH/CLIN. Ils sont associés à des prélèvements de surface dans le cadre d'une recherche de flore fongique. Pour - Avoir une image de la contamination microbiologique (particules viables et cultivables) à un instant « T », - Mettre en évidence d'éventuelles dérives : dans ce cas, il est impératif de réaliser les prélèvements en nombre suffisant et toujours dans les mêmes conditions car la numération n'est en aucun cas le nombre exact de micro-organismes présents, - Compléter la recherche de flore fongique (<i>Aspergillus</i>....) dans l'air par des contrôles de surfaces car le passage du « nuage » aspergillaire est bref et les prélèvements de surface permettent d'améliorer la recherche (vision dans le temps de la sédimentation des spores, sous réserve que les surfaces n'aient pas un bionettoyage régulier)⁽⁹⁾. - En qualification opérationnelle la NF S90351 précise que pour la « classification microbiologique de l'air : un plan d'échantillonnage est défini pour être joint à l'appel d'offres en se référant à la norme NF EN ISO 14698 parties 1 et 2. L'utilisateur doit faire référence aux textes réglementaires auxquels il est soumis (BPPH⁽¹⁰⁾, BPP⁽¹³⁾) ».	Objectif : Dénombrement des particules à l'aide de compteurs de particules physiques en cours de validité. Méthode : L'analyse de la contamination particulaire de l'air peut se faire de 2 manières : 1. La classe d'empoussièrement (statique)¹² La propreté particulaire doit être définie pour un ou plusieurs des trois états d'occupation définis par la norme NF EN ISO 14644-1 et 2 (2016) : à réception ou après construction, au repos et en activité : - s'il s'agit d'une qualification : le respect de la norme est indispensable et le nombre de points à prélever est défini en fonction de la surface de la zone (NF EN ISO 14644-1 et 2 (2016), annexe 3) - s'il s'agit d'une surveillance en routine : l'analyse de risque doit prendre en compte la source d'émission des particules : ▪ $\geq 0,5 \mu\text{m}$ ou inférieures (représentatives de la qualité de l'air délivré par système de traitement d'air) ▪ $\geq 1^{13}$ et $5 \mu\text{m}^{14}$ (représentatives des procédures de nettoyage/et de l'émission par les personnes). ▪ et utiliser des compteurs de performance identique (débit,...) en respectant la même méthodologie. Pour - Disposer d'éléments pour qualifier ou requalifier une salle (démontrer la conformité aux exigences requises suivant la classe spécifiée), - Surveiller la qualité de l'air par rapport aux critères attendus et détecter d'éventuelles dérives (en dehors des phases de qualification). 2. La cinétique d'élimination des particules (dynamique)¹⁵ La cinétique d'élimination des particules n'est pas une analyse réalisée en routine. Elle est demandée lors des qualifications de zone ou quand se pose un problème évoquant un dysfonctionnement de la ventilation (classe d'empoussièrement non conforme, classe de biocontamination non conforme et non expliquée, lors d'une épidémie...); Deux approches sont possibles pour déterminer la cinétique d'élimination des particules : - dans une salle en activité, en fin de programme : mesurer la contamination particulaire lors de la sortie des occupants de la salle, puis réaliser des mesures successives jusqu'à ce que la concentration particulaire initiale soit atteinte, - dans une salle hors activité : provoquer un « empoussièrement » artificiel quantifié et standardisé puis effectuer des mesures successives jusqu'à ce que la concentration particulaire initiale soit atteinte. Pour - Connaître le temps minimal pour qu'une salle (zone) retrouve son état initial après l'arrêt de l'activité (temps de repos), - Evaluer la performance du système de traitement d'air.

¹² D'après la norme ISO/DIS14644-1 (2014) la classification d'une salle ou d'une zone propre est définie comme le niveau de propreté particulaire de l'air applicable à cette salle. Ce niveau est spécifié en termes de classes ISO, pour lesquelles sont définies des concentrations maximales admissibles pour chaque taille de particules.

¹³ Les tailles $\geq 0,5$, 1 et $5 \mu\text{m}$ sont demandées par les bonnes pratiques de stérilisation⁽¹⁰⁾⁽¹¹⁾.

¹⁴ Pour la classe ISO 5 : les limites de l'échantillonnage et de l'exploitation statistique des résultats rendent inappropriés la mesure des particules de taille $\geq 5 \mu\text{m}$ du fait de leur faible quantité dans cette classe de risque.

¹⁵ La cinétique d'élimination des particules permet d'apprécier les performances de la centrale de traitement d'air et l'efficacité dynamique de cette installation. Elle est définie par le temps nécessaire pour réduire de 90 % le niveau de contamination particulaire d'une salle venant d'être utilisée. La limite de classe est fixée par un temps maximal de décontamination.

Stratégie pour les contrôles microbiologiques de l'eau : Quoi, où, quand, comment ?

Les contrôles microbiologiques de l'eau ne sont réglementés que pour les paramètres de potabilité et pour le paramètre légionnelle.

Quoi ?

On recherche :

- des micro-organismes (bactéries) tels que ceux prévus par les textes réglementaires et/ou les recommandations,
- des micro-organismes ciblés (bactéries, champignons, parasites, virus) dans le cadre d'une investigation (comme une épidémie suspectée être d'origine hydrique...).

Pour

- Evaluer la conformité d'une eau à une spécification réglementaire de qualité,
- Disposer d'indicateurs de résultats contribuant à assurer la sécurité de l'usage de l'eau :
 - caractérisation de toute contamination, son niveau, ses variations aléatoires, l'existence de tendance ou de cycles...,
 - détection d'une biodégradation de la qualité de l'eau dans le réseau,
 - prévention de problèmes sanitaires liés à l'eau.

Où ?

Dans l'établissement de santé, les prélèvements d'eau sont effectués sur les points utilisés à des fins de consommation humaine, sanitaires, de soins, de traitement des dispositifs médicaux (DM)...

Il convient de disposer des plans des réseaux d'eau chaude et froide et de l'aide de l'ingénieur et/ou de personnels techniques pour élaborer judicieusement la cartographie des risques et le plan d'échantillonnage.

Les points d'échantillonnage doivent être choisis en :

- définissant des points critiques de l'établissement afin de surveiller les évolutions de la qualité dans le réseau (cf. chapitre prélèvement) ;
- prenant en compte, dans le programme de surveillance, les évolutions microbiologiques en fonction des variations possibles de la température de l'eau froide ou chaude ;
- prenant en compte les points « à risques » soit de par leur localisation (zone stagnante, bras morts), soit de par l'usage qui en est fait (douche, aérosol...) ou des personnes exposées.

C'est pour cela que le plan d'échantillonnage¹⁶ doit intégrer des points critiques (a priori ceux où le risque de contamination est majoré) et des points alimentant des patients fragiles... Situés dans un environnement propre et facilement accessible, ils représentent :

- des points techniques : aval du compteur, vannes de départ et retour de boucle, vanne de pied de colonnes, ballon d'eau chaude, points sur la chaîne de production d'eau de dialyse, d'un procédé de traitement d'eau (adoucisseur, filtre, osmose...)...
- des points d'usage : robinet, douche.... avec comme objectifs de contrôler :
 - les conditions de maîtrise du réseau interne (eau qui parvient au point d'usage),
 - l'exposition (eau telle qu'elle est utilisée),
 - l'efficacité d'un traitement.

¹⁶ Le guide de l'eau (2005) ⁽¹⁴⁾ précise que : « Les prélèvements doivent être réalisés selon une stratégie d'échantillonnage statistiquement valable, c'est-à-dire un plan d'échantillonnage tenant compte de la structure du réseau, de la fréquentation et des usages afin que l'analyse représente une image la plus fiable possible de la qualité au sein de chaque bâtiment et/ou des divers étages des bâtiments. L'eau distribuée est généralement de moins bonne qualité aux points les plus éloignés du réseau et dans les zones stagnantes. Le programme d'échantillonnage doit donc être établi en fonction de la taille de l'établissement et selon le nombre d'unités individualisées, les zones à risques ou encore le budget disponible. ».

Pour

- Obtenir une image la plus fiable de la qualité de l'eau utilisée car les micro-organismes ne forment pas une solution parfaite dans l'eau mais une suspension ayant son propre degré d'hétérogénéité,
- Disposer de points représentatifs : les micro-organismes sont fixés majoritairement sous forme de micro-colonies ou de biofilms à la surface interne des canalisations. Le relargage de ce dernier, fonction des forces de cisaillement (ouvertures des robinets, purges, « coup de bélier »...) exercées, influe sur la concentration des micro-organismes retrouvés dans l'échantillon.

Quand ?

Les horaires et la fréquence des prélèvements d'eau sont planifiés avec le laboratoire (pour prendre en compte les contraintes de fonctionnement et les contraintes de lecture des cultures telles que définies par les normes). Ils sont, autant que possible, programmés aux mêmes horaires (pour éviter les variations liées à l'utilisation de l'eau).

Ils sont nécessaires avant ouverture, après travaux, avant réouverture d'un service (en fonction du contexte et après analyse de risque avec l'EOH) en prévoyant les délais induits par l'analyse et les mesures correctives éventuelles...

La fréquence des contrôles est souvent fixée par la réglementation ou les recommandations. Ils doivent être réalisés à distance d'une procédure de désinfection du circuit et non juste après ! Par exemple pour les légionelles la *Circulaire DGS/EA4 n° 2010-448 du 21 décembre 2010* précise : « afin que les résultats d'analyses soient représentatifs de l'efficacité des opérations de désinfection curative, les prélèvements d'eau pour analyse de « recontrôle » des légionelles doivent être réalisés au moins 48 heures après la mise en œuvre de la désinfection pour vérifier son efficacité, et après un délai de 2 à 8 semaines pour s'assurer de l'effet de l'ensemble des mesures mises en place (équilibre des réseaux, suppression des bras morts, etc.) et de l'absence de recolonisation des réseaux »

Pour

- Réduire les délais entre prélèvement et analyse (planification programmée),
- Eviter les variations liées à l'utilisation de l'eau : phénomène de « rinçage » et/ou de « dilution » (ex : tirage important pour les toilettes des patients, ...),
- S'assurer que l'on est bien revenu à la qualité initiale après travaux qui auraient pu perturber le réseau d'eau.

Comment ?**Les prélèvements sont réalisés hors cycle de désinfection des réseaux.**

Les méthodes de contrôle sont adaptées à l'objectif :

- Qualité de l'eau dans les conditions d'utilisation : prélèvement sans désinfection ni purge (premier jet) ;
- Remarque : pour l'eau à usage de soins standard, on utilise le plus souvent de l'eau mitigée (eau froide + eau chaude) et le contrôle portera sur cette eau ;
- Qualité de l'eau dans le réseau interne de l'établissement (eau qui parvient au point d'usage) ; prélèvement après démontage des accessoires (aérateur, pommeau de douche...), désinfection et purge : de 30 secondes minimum pour les analyses type potabilité/soins standards à 2 à 3 minutes pour la recherche de légionelles (eau chaude sanitaire, tour aéroréfrigérantes).

Pour

- Connaître les conditions d'exposition pour les utilisateurs des points d'eau,
- Apprécier les conditions de maîtrise du réseau,
- Mettre en place la CAT la plus adaptée et non disproportionnée par rapport à la contamination (coût élevé et pouvant dégrader le réseau).

Rappel : Les critères de potabilité sont définis par les articles R.1321-1 à R.1321-5, du code de la santé publique (Décret 2001-1220 du 20 décembre 2001), relatifs aux eaux destinées à la consommation humaine à l'exclusion des eaux minérales naturelles. L'innocuité de l'eau d'entrée doit être garantie vis-à-vis de la population de l'établissement y compris les paramètres microbiologiques (flore aérobie revivable). En pratique, le guide de l'eau 2005⁽¹⁴⁾ propose : « Afin de minimiser les frais analytiques, un dialogue est indispensable avec les autorités chargées de la surveillance analytique des eaux potables (ARS) et le producteur d'eau local. Il est conseillé que le point d'alimentation de l'établissement de santé figure comme point de référence entrant dans le programme analytique de surveillance du réseau public de la commune concernée. Le directeur de l'établissement de santé, qui est responsable de la qualité de l'eau aux points d'usage, peut disposer ainsi, en s'adressant à l'ARS et au producteur d'eau, de résultats détaillés communiqués régulièrement pris en charge par l'exploitant du réseau de distribution.

Tableau 1 : Liens hypertextes par thème				
GENERALITES (communes aux 4 thèmes)	Chapitre 1 Stratégie (p 17)	Chapitre 3 Prélèvement (p 41)	Chapitre 4 Analyse (p 720)	Chapitre 5 Interprétation (p 84)
AIR	Stratégie (p 21)	Prélèvement CP (p 45) Aerobio (p 50)	Analyse (p 73)	Interprétation (p 86)
EAU	Stratégie (p 25)	Prélèvement (p 54)	Analyse (p 75)	Interprétation (p 90)
SURFACES	Stratégie (p 28)	Prélèvement (p 60)	Analyse (p 78)	Interprétation (p 92)
ENDOSCOPES	Stratégie (p 31)	Prélèvement (p 64)	Analyse (p 81)	Interprétation (p 95)

Stratégie pour les contrôles microbiologiques des surfaces : Quoi, où, quand, comment ?

Il n'y a pas de textes réglementaires spécifiques pour la surveillance microbiologique des surfaces. Les normes (NF S90-351 (2013), NF EN ISO 14698-1 (2004)) ou les recommandations de sociétés savantes ⁽¹⁾ ⁽⁶⁾ ⁽¹¹⁾ traitant de l'environnement abordent plus ou moins ce sujet et peuvent servir de base de travail pour les établissements de santé.

Quoi ?

On recherche des micro-organismes (bactéries, levures, champignons filamenteux) présents sur une surface.

Pour

- Contrôler des points critiques identifiés par une analyse de risque intégrée dans une démarche qualité ou dans un programme d'assurance qualité (bloc opératoire, stérilisation, pharmacie à usage interne, cuisine...);
- Mettre en œuvre des recommandations de bonnes pratiques (ex : stérilisation...);
- Contribuer à une meilleure connaissance de la contamination aérienne (sédimentation des particules de l'air) en particulier lors de suivi de travaux dans les secteurs à empoussièrisme maîtrisé ou secteurs adjacents;
- Aider à la validation¹⁷ des procédures de bionettoyage des surfaces lors des changements de produit ou de méthode;
- Rechercher une origine environnementale dans le cadre d'une enquête épidémiologique qui le justifie;
- Visualiser la qualité microbiologique de l'environnement dans un but pédagogique.

Remarque : En aucun cas, ces prélèvements d'environnement ne doivent être systématiques en dehors du cadre très spécifique d'une démarche qualité (exemples : bloc opératoire, stérilisation ou HACCP en cuisine...) ⁽¹⁾ ou d'une investigation pour laquelle le rôle de l'environnement est suspecté.

Où ?

Hors contexte épidémique ou pédagogique, les prélèvements sont effectués dans :

- ZEM (ISO 5 à ISO 8),
- Locaux ou zones en démarche qualité¹⁸ : stérilisation, cuisine, blanchisserie, laboratoires...

Les points de prélèvements sont définis après analyse de risque et reportés sur le plan des locaux ou plan d'échantillonnage, ils peuvent représenter des :

- **Points ciblés :** les points et la méthode de prélèvement sont prédéfinis et fixes pendant toute une campagne de prélèvement;
- **Points aléatoires :** le plan d'échantillonnage est établi au coup par coup à chaque série de prélèvement.

En règle générale, les prélèvements au niveau des sols¹⁹ et murs ne présentent pas d'intérêt sauf dans le cas de la surveillance du risque « fongique ».

Il est préconisé ⁽¹⁾ de prélever les points représentatifs du risque infectieux le plus élevé pour les patients après analyse de risque (points autour du patient et d'autres points à distance et en hauteur sur des surfaces planes) comme par exemple :

- en zone opératoire en salle d'intervention (NF S90-351 (2013)) : 5 à 10 points (table opératoire, poignée scialytique, chariot, amplificateur de brillance, rampe technique, poignée de porte tiroirs, interphone, bras de fluides et surfaces en hauteur...);

¹⁷ Validation de méthode demande une méthodologie rigoureuse et éprouvée sur le plan statistique.

¹⁸ Exemples de systèmes de management de la qualité : HACCP (cuisine) ; RABC (blanchisserie) ; Cofrac (laboratoires)....

¹⁹ Les prélèvements de sol peuvent contribuer à la mise en évidence des problèmes bactériologiques spécifiques aux sols (autolaveuse contaminante par exemple), même si le risque infectieux lié au sol est minime.

- dans une chambre avec traitement d'air : 5 à 10 points (table de nuit, pied du lit, adaptable, dessus éclairage, téléphone, télécommande, poignée de porte...) ;
- dans la zone de conditionnement en stérilisation : 5 à 10 points sur les paillasse et en zone de stockage suivant la superficie ;
- dans un poste de sécurité microbiologique (flux laminaire) : 3 points minimum au niveau de la zone de travail sous le flux.

Pour

- Permettre un suivi comparatif dans le cadre de contrôles de points ciblés ;
- Permettre une estimation de la conformité sur l'ensemble des points (en général pourcentage de points conformes) quand on utilise les points aléatoires ;
- Contribuer à l'estimation de la maîtrise conformité d'un traitement d'air (flux laminaire) dans les zones où sont hébergés des patients potentiellement réceptifs à un risque infectieux fongique (neutropéniques, greffés...).

Quand ?

Sauf recommandations spécifiques les horaires de prélèvements sont planifiés de préférence hors présence humaine, après bionettoyage et zone inoccupée depuis au minimum depuis 3 CP_{0.5} quand il est connu ou au moins 1 heure (ZEM). Dans les autres situations (hors ZEM), les prélèvements sont réalisés à la fin du bionettoyage après séchage et temps d'action du produit ($\approx 1/4$ heure).

Pour certains secteurs (stérilisation, thérapie cellulaire ...), des recommandations spécifiques prévoient de réaliser des prélèvements de surface hors présence humaine (indicateur d'efficacité du bionettoyage) et en présence humaine (indicateur de bonnes conditions de maîtrise de la contamination en activité).

Concernant la fréquence, mis à part la pharmacie à usage interne²⁰ (qui demande une fréquence « régulière ») et la thérapie cellulaire⁽¹²⁾ (qui demande une fréquence « mensuelle »), il n'existe pas de textes réglementaires ni d'obligations pour la périodicité des prélèvements.

Pour la stérilisation il n'y a pas d'obligations de périodicité mais uniquement propositions de l'AFS dans son document « maîtrise et contrôle d'environnement en stérilisation »⁽¹¹⁾.

Dans les blocs opératoires, la plupart des établissements français optent pour une périodicité trimestrielle ou semestrielle⁽¹⁵⁾.

Pour

- Etablir un « tableau de bord » pour permettre un suivi dans le temps ;
- Permettre, grâce au tableau de bord, de mettre en évidence et de rectifier d'éventuelles dérives²¹ ;
- Modifier, grâce à l'historique des résultats et avec un argumentaire adapté, le plan d'échantillonnage qui ne doit pas rester figé dans le temps mais être évolutif en fonction des résultats, des modifications de procédures... Les points toujours « conformes » ne sont finalement pas critiques et peuvent être retirés du plan d'échantillonnage : cela permet d'inclure d'autres points pour tester leur criticité.

²⁰ Bonnes pratiques de pharmacie hospitalière⁽¹⁰⁾, circulaire du 20 octobre 1997, BPP⁽¹³⁾ et BPF⁽¹⁶⁾.

²¹ La norme ISO 14698-2 (2003) précise que « Les données provenant d'un seul échantillon ne sont souvent pas significatives; de surcroît, les techniques de surveillance microbiologique peuvent comporter de graves carences qui ont pour résultat un degré élevé de variabilité. Une présentation graphique des résultats obtenus sur une période de temps donnée peut donc s'avérer utile afin de distinguer les variations d'échantillonnage des tendances ou pour indiquer qu'un changement significatif est bien intervenu, en dépit du fait que les résultats se situent en deçà des limites spécifiées. ».

Comment ?

La ou les méthode(s) est (sont) choisie(s) en fonction des objectifs mais la même méthodologie est recommandée pour une meilleure reproductibilité. Les deux principales techniques utilisées sont :

Méthode par empreinte gélosée	Méthode par écouvillonnage
Objectif : Détection de micro-organismes viables et aérobies sur des surfaces planes, pleines, lisses et sèches, plutôt dans le cadre d'une démarche qualité. Méthode : Récupérer les micro-organismes « détachables » et cultivables en appliquant directement un milieu gélosé sur la surface à prélever de façon standardisée (temps de contact et pression exercée sur la boîte). Pour - Détecter la présence de micro-organismes cultivables aérobies, - Contribuer à la connaissance de l'écosystème d'une surface donnée (aspect qualitatif), - Quantifier le nombre de micro-organismes cultivables et « détachables » de la surface (rendement) par des méthodes testées, validées et reproductibles.	Objectif : Détection de micro-organismes viables (aérobies et/ou anaérobies) sur des surfaces irrégulières non planes et/ou des zones difficiles d'accès et/ou pour des recherches ciblées (conditions de culture particulières, épidémie... Méthode : Récupérer les micro-organismes « détachables » et cultivables en écouvillonnant la surface à prélever. Remarque : en dehors des écouvillons, il existe d'autres supports de prélèvements (éponges, carrés d'essuyage...) qui permettent d'échantillonner de grandes surfaces. Pour - Prélever les zones irrégulières ou difficiles d'accès, - Apprécier de manière qualitative la flore microbienne, - Apprécier grossièrement le nombre de micro-organismes présents (aspect semi quantitatif), - Adapter les conditions et milieux de culture aux micro-organismes recherchés (par exemple <i>Clostridium difficile</i>...).

Tableau 1 : Liens hypertextes par thème				
GENERALITES (communes aux 4 thèmes)	Chapitre 1 Stratégie (p 17)	Chapitre 3 Prélèvement (p 41)	Chapitre 4 Analyse (p 720)	Chapitre 5 Interprétation (p 84)
AIR	Stratégie (p 21)	Prélèvement CP (p 45) Aerobio (p 50)	Analyse (p 73)	Interprétation (p 86)
EAU	Stratégie (p 25)	Prélèvement (p 54)	Analyse (p 75)	Interprétation (p 90)
SURFACES	Stratégie (p 28)	Prélèvement (p 60)	Analyse (p 78)	Interprétation (p 92)
ENDOSCOPES	Stratégie (p 31)	Prélèvement (p 64)	Analyse (p 81)	Interprétation (p 95)

Stratégie pour les contrôles microbiologiques en endoscopie (endoscopes non stérilisables à canaux, LDE, ESET) : Quoi, où, quand, comment ?

Il n'y a pas de textes réglementaires à ce jour : les documents «Eléments d'assurance qualité en hygiène relatifs au contrôle microbiologique des endoscopes et à la traçabilité en endoscopie »⁽³⁾, « Guide pour l'utilisation des laveurs désinfecteurs d'endoscopes »⁽⁴⁾ et « Enceintes de stockage d'endoscopes thermosensibles (ESET) »⁽⁵⁾ sont actuellement utilisés comme référentiels.

Attention : Une instruction est en cours de rédaction et sera publiée en 2016. C'est un document unique qui concerne le traitement des endoscopes souples thermosensibles. Dès sa parution, ce texte sera la référence réglementaire à appliquer.

Les endoscopes

Quoi ?

On recherche de micro-organismes (bactéries, champignons) faciles à mettre en évidence (flore aérobie revivifiable) et indicateurs de dysfonctionnements éventuels du procédé de nettoyage ou de l'intégrité de l'endoscope hors contexte d'investigation.

Pour

- Mettre en œuvre les recommandations de bonnes pratiques⁽³⁾ ;
- Evaluer quantitativement le niveau de contamination en dénombrant la flore aérobie revivifiable : indicateurs de dysfonctionnement (nettoyage), d'usure anormale, de matériel défectueux... ;
- Soupçonner une contamination éventuelle par des micro-organismes potentiellement responsables d'infections mais plus difficiles à mettre en évidence (conditions spécifiques de culture) comme *Helicobacter*, *Legionella*, *Mycobacterium*... ;
- Participer à l'évaluation de l'efficacité des procédures de traitement en vigueur dans l'établissement, que celles-ci soient manuelles ou automatisées dans un laveur-désinfecteur (contrôle de résultat) ;
- Aider à l'évaluation et à la validation des conditions de stockage des endoscopes.

Où ?

Prélèvement global des canaux et, si résultats non conformes, prélèvement canal par canal ± prélèvements associés (connectiques, bouchons, valves...).

Pour

- Obtenir un « instantané » de l'état microbiologique de l'endoscope (prélèvement global) ;
- Effectuer des recherches spécifiques de l'état microbiologique de chaque canal en cas de résultats non-conformes du prélèvement global (prélèvement canal par canal) ;
- Réaliser un contrôle de l'état microbiologique des connectiques, bouchons valves... : **uniquement** dans le cadre d'une investigation (prélèvements associés) ;
- Aider à l'investigation dans le cas d'une exposition sérieuse à un risque infectieux (plusieurs patients exposés en « série »).

Quand ?

La planification du contrôle doit être :

- organisée (EOH, service, prestataire et si besoin biomédical),
- compatible avec l'activité du service.

De façon générale, les endoscopes doivent être prélevés :

- pour les endoscopes utilisés en cavité stérile :
 - soit en conditions d'utilisation : c'est-à-dire tout de suite après la désinfection,
 - soit en conditions « défavorables » pour « optimiser » le prélèvement : c'est à dire après un temps de latence défini dans le CCTP et/ou les protocoles ;
- pour les autres endoscopes : après avoir subi un cycle normal d'entretien (désinfection ou nettoyage + désinfection) après un temps de latence défini dans les protocoles et inscrit dans le CCTP.

Pour

- Optimiser la mise en évidence des éventuels micro-organismes par un temps d'attente suffisant avant prélèvement pour favoriser leur multiplication ;
- Eviter des prélèvements trop précoces (après désinfection) qui risquent d'entraîner des résultats faussement négatifs.

La fréquence des prélèvements est fonction de l'objectif :

- En routine : contrôles programmés (endoscope reste en service)²²
 Le guide du CTINILS de 2007 ⁽³⁾ précise : « *Au-delà de l'état des lieux initial et des contrôles ponctuels, et, en l'absence d'études de références et de consensus d'experts, il n'est pas proposé de fréquence programmée de contrôles microbiologiques des endoscopes thermosensibles. En revanche, il est expressément recommandé que le CLIN de chaque établissement (ou la sous-commission de la CME chargée des mêmes attributions) programme annuellement le nombre d'endoscopes à contrôler (le parc dans son ensemble ou à défaut un échantillon représentatif par type d'endoscopes et par centre de traitement). Dans ce dernier cas, l'échantillonnage s'appuie sur les critères suivants : ancienneté, fragilité et complexité des matériels, importance du parc d'endoscopes, fréquence d'utilisation, procédures de traitement des endoscopes qu'elles soient automatisées ou manuelles.* ». »
Il appartient donc à l'EOH et/ou au CLIN d'établir le programme de surveillance en fonction de l'analyse de risque (type d'endoscope, utilisation, usure ...). Toutefois, il ne faut pas hésiter à augmenter la fréquence des contrôles pour les endoscopes « à risque » (par exemple trimestrielle : duodénoscopes, échoendoscopes....) pour une bonne gestion du risque et pour limiter les rappels de patients en cas de problèmes infectieux potentiellement liés à un endoscope.

Pour

- Obtenir un « instantané » de la qualité microbiologique des endoscopes,
- Aider à la détection d'un éventuel dysfonctionnement dans le processus de traitement.

- Lors de contrôles ponctuels (endoscope non utilisable jusqu'à obtention des résultats) :
 - au retour de réparation ou de maintenance, avant utilisation d'un matériel neuf ou de prêt...,
 - lors de changements de processus de traitement,
 - lors d'une investigation d'un ou plusieurs cas d'infection(s) associée(s) aux soins pouvant faire suspecter la responsabilité d'un endoscope.

Pour

- Vérifier l'état microbiologique de l'endoscope avant utilisation,
- Valider ou non une hypothèse lors d'épidémie quand l'enquête oriente vers cette source de contamination.

²² Pour mémoire : L'état des lieux est la première étape de la mise en place des contrôles : état des lieux de la qualité microbiologique de tout le parc d'endoscopes (sur une durée maximale de 6 mois). Il sert à établir la ligne de base de la qualité microbiologique du parc des endoscopes.

Comment ?

Ces prélèvements sont réalisés par des personnes formées ayant une bonne connaissance de l'endoscope et de son fonctionnement et des prélèvements. Ils doivent être réalisés avec une solution de prélèvement spécifique stérile.

Pour

- Prendre en compte la structure complexe et la fragilité du matériel,
- Respecter la nécessité de prélever dans des conditions rigoureuses d'asepsie.

L'eau utilisée en endoscopie (traitement manuel ou LDE)

Le tableau 3 résume la stratégie des contrôles de l'eau en endoscopie.

Tableau 3 : Stratégie des contrôles de l'eau en endoscopie				
Quoi ?	Où ?	Quand ?	Comment ?	Pour
Si entretien manuel : eau de rinçage terminal	Eau du réseau pour rinçage final	1 fois par trimestre	Suivant les modalités habituelles de prélèvement d'eau au point d'usage	Vérifier la qualité microbiologique de l'eau
	Eau microfiltrée pour rinçage final	Pas de contrôle si l'eau est microfiltrée avec des filtres à usage unique ²³		
Si entretien automatisé en LDE : eau de rinçage terminal, eau d'alimentation du LDE	Eau alimentant la machine	1 fois par trimestre	Suivant guide LDE ⁽⁴⁾ ou recommandations du fabricant ou	- Mettre en évidence d'éventuelles contaminations de l'eau ; - Détecter un éventuel dysfonctionnement de l'appareil ; - Eliminer cette cause quand un prélèvement d'endoscope est non conforme.
	Eau après le système de pré traitement d'eau(1)	1 fois par trimestre		
	Eau de rinçage final	1 fois par mois		

(1) : quand il y a un système de prétraitement.

L'enceinte de stockage des endoscopes thermosensibles (ESET)

Le tableau 4 résume la stratégie des contrôles en ESET.

Tableau 4 : Stratégie des contrôles des enceintes de stockage des endoscopes thermorésistants (ESET)				
Quoi ?	Où ?	Quand ?	Comment ?	Pour
ESET	Endoscopes de chaque famille stockés dans l'ESET	A minima la surveillance annuelle (échelonnée sur l'année)	Prélèvement « global »	- Vérifier la qualité microbiologique de l'intérieur de l'ESET - Détecter un éventuel dysfonctionnement de l'ESET
	Surfaces (a)	1 fois par trimestre NF S 98-030 (2012) (c), NF EN 16442 (2015) (d)	Par empreinte gélosée	
	Air (b)	NF S98-030 (2012) (c) : 1 fois par trimestre NF EN 16442 (2015) : lors de la qualification	- Aérobiocontamination : ▪ par sédimentation ▪ par biocollecteur - Comptage particulaire : uniquement si le fabricant revendique une propreté particulaire donnée	

(a) : seuls les prélèvements par empreinte gélosée sont prévus dans les textes relatifs aux ESET. Suivant la norme NF EN 16442 (2015), les prélèvements de surface sont réalisés avant entretien (reflètent ainsi la qualité de l'air dans l'enceinte).

(b) : seulement pour les ESET revendiquant une classe de contamination particulaire.

(c) : la fréquence des prélèvements (aérobiocontamination ou surfaces) est celle préconisée dans les textes (trimestrielle) ou celle préconisée par le fournisseur. Si plusieurs sous-unités : prélever l'unité la plus représentative pour l'air ; pour les surfaces, toutes les sous-unités doivent avoir été prélevées dans l'année.

(d) : la norme européenne NF EN 16442 (2015) préconise le contrôle microbiologique de l'air uniquement pour la qualification de performance et pas en routine.

²³ EBM (eau bactériologiquement maîtrisée) : si elle est obtenue à l'aide d'un filtre terminal à usage unique, validé par le fabricant : le contrôle de l'eau n'est pas nécessaire à condition de valider l'utilisation des filtres (mise en place, durée d'utilisation...) et de ne rajouter aucune connectique non stérile en aval du filtre (audit de pratiques).

Tableau 1 : Liens hypertextes par thème				
GENERALITES (communes aux 4 thèmes)	Chapitre 1 Stratégie (p 17)	Chapitre 3 Prélèvement (p 41)	Chapitre 4 Analyse (p 720)	Chapitre 5 Interprétation (p 84)
AIR	Stratégie (p 21)	Prélèvement CP (p 45) Aerobio (p 50)	Analyse (p 73)	Interprétation (p 86)
EAU	Stratégie (p 25)	Prélèvement (p 54)	Analyse (p 75)	Interprétation (p 90)
SURFACES	Stratégie (p 28)	Prélèvement (p 60)	Analyse (p 78)	Interprétation (p 92)
ENDOSCOPES	Stratégie (p 31)	Prélèvement (p 64)	Analyse (p 81)	Interprétation (p 95)

Chapitre 2

Éléments pour le cahier des clauses techniques particulières (CCTP)

Le cahier des clauses techniques particulières (encore appelé cahier des charges) est le document dans lequel le client (établissement de santé...) définit les prescriptions techniques pour la réalisation des opérations de prélèvements et d'analyses environnementales (eau, air, surfaces ...) qu'il demande au prestataire.

Pour certaines analyses le prestataire (laboratoire d'analyse et ses sous-traitants éventuels) doit être accrédité conformément à la réglementation (ex : légionelles...), voire agréé²⁴ (ex : contrôle sanitaire des eaux destinées à la consommation humaine). Il est nécessaire de vérifier que le laboratoire est bien accrédité pour le paramètre par le contrôle demandé (demander copie de l'attestation d'accréditation ou la consulter sur le site du Cofrac (<http://www.cofrac.fr/fr/home/>)).

Le prestataire tiendra à disposition du client :

- le manuel d'assurance qualité (MAQ),
- les certificats d'étalonnage,
- les documents de traçabilité.

Points importants

Pour chaque prestation demandée, ne pas oublier :

- **D'indiquer le contexte et/ou les objectifs** : contrôles de routine, qualifications, démarche qualité ;
- **De préciser les caractéristiques utiles pour le prélèvement et l'interprétation des résultats** : classe de risque, classe de propreté particulière et/ou microbiologique, traitements (désinfectants, produits anticorrosion...) ;
- **De vérifier pour le prélèvement** :
 - si les mesures ou vérifications à effectuer in situ (température, pH pour l'eau, pressions pour les ZEM....) sont clairement précisées,
 - si le prélèvement est à la charge du prestataire ou du client,
 - si les conditions de prélèvements sont définies (accompagnant sur place, tenue adaptée au site...),
 - si des fiches d'identité des points à prélever sont prévues et disponibles ;
- **De préciser les caractéristiques des analyses microbiologiques demandées** :
 - catégories concernées : eau (potable, chaude mitigée), air, surfaces, endoscopes...,
 - analyses à effectuer pour chaque catégorie, voire pour chaque point de prélèvements (ex : flore aérobie revivifiable à 22°C, à 36°C, autres micro-organismes (*E. coli*, Entérocoques..., comptage particulière, aérobiocontamination...)) ;
- **D'anticiper les coûts supplémentaires et la réactivité du prestataire** :
 - prévoir les modalités pour des compléments d'analyse en cas de résultats non-conformes (coûts et délais),
 - prévoir les analyses qui pourraient être commandées au-delà du programme annuel de surveillance (contrôles après action corrective, survenue d'infection) et les délais de mise en œuvre.

Tarification

Il est important de préciser les modalités de facturation des analyses. Il est préférable que les prestations programmées correspondent à un prix forfaitaire.

La facturation du forfait annuel peut s'échelonner en plusieurs fois et la facturation peut aussi être divisée en plusieurs parties :

- forfait déplacement : coût de la mise à disposition personnel, véhicule, matériel... (même lieu, même jour),
- forfait contrôle (coût prélèvement et analyse) : personnel, consommables à la charge du prestataire, contrôles qualité (analytique, pré et post analytique),

²⁴ Liste des laboratoires agréés disponibles sur <http://www.sante.gouv.fr/laboratoires-agrees-pour-le-contrôle-sanitaire-des-eaux.html>. « L'agrément est subordonné à une accréditation préalable selon la norme ISO/CEI 17025 »

- facturation des rapports, bilans (statistiques) : coût suivant la demande,
- préciser par exemple :
 - que tous les prélèvements effectués un même jour en un même lieu ne donneront lieu qu'à un seul forfait déplacement ;
 - que tout prélèvement hors plan donnera lieu à un forfait déplacement supplémentaire sauf s'il doit être réalisé en sus d'un ou plusieurs prélèvement(s) programmé(s) ;
 - les conditions d'annulation (tarifaires, délai...) par l'une ou l'autre des parties.

Prélèvement

Le plan d'échantillonnage

- Est validé par l'établissement de santé,
- Est joint au CCTP.

La planification

- Est réalisée en accord entre le prestataire et le client (établissement de santé), l'EOH et les services techniques et/ou de soins si besoin,
- Fait l'objet de l'élaboration d'un planning prévisionnel annuel, indispensable dès le début du marché. Toute modification/report doit être officialisée avant l'intervention. (par exemple : avis écrit dans un délai défini (par exemple : « au moins huit jours ») avant la date prévue si le calendrier est modifié par l'une ou l'autre des parties).

Les préleveurs

- Sont formés ou mieux habilités,
- Peuvent être accompagnés par un membre du personnel de l'établissement de santé le jour de l'intervention,
- Ne peuvent être tenus pour responsables si les points de prélèvements définis avec le client ne sont pas accessibles le jour de l'échantillonnage, mais doivent le signaler et le tracer (ex : fiche de non-conformité),
- Doivent appliquer les protocoles et consignes du service (habillement, discrétion,...).

Le prélèvement proprement dit

- Est facilité par l'existence de moyen de reconnaissance sur place des points de prélèvements : (fiches d'identité, photos du lieu de prélèvement, code barre....) décrits dans le cahier des charges ;
- Intègre les informations concernant des observations, des difficultés ou dysfonctionnements repérés lors de la réalisation du prélèvement qui seront mentionnées sur le document accompagnant l'échantillon et qui seront reportées par le laboratoire sur le compte-rendu d'analyse ;
- Prévoit l'impossibilité humaine ou matérielle, de réaliser les prélèvements et les analyses prévues « sous accréditation » comme par exemple la recherche et le dénombrement de *Legionella* et *Legionella pneumophila*. Dans ce cas le laboratoire peut soit repousser les prélèvements en accord avec le client, soit faire appel à un sous-traitant accrédité suivant les mêmes modalités. Les résultats émis par le sous-traitant seront systématiquement vérifiés par le laboratoire avant d'être transmis au client ;
- Prévoit l'impossibilité « technique » d'effectuer ou d'identifier le prélèvement avec ou non facturation et possibilité de le remplacer par un point proximal (expérience et adaptabilité du préleveur) sur le même réseau (à facturer ou pas). La représentativité du nouveau point n'étant pas forcément identique à celle de l'ancien, il faut se positionner dans le cahier des charges.

Les conditions de transport

Il est important de préciser :

- le matériel et les conditions de transport notamment pour le transport réfrigéré,
- le délai maximum d'acheminement au laboratoire et de mise en culture,
- la traçabilité des conditions de transport.

Le matériel

- Le matériel peut être imposé dans le cahier des charges : débit minimal du compteur de particules, nature des milieux de culture pour les analyses microbiologiques, applicateur pour les empreintes gélosées... ;
- La fiche de prélèvement : établie ou, au minimum validée, par l'établissement de santé à détailler en fonction des catégories concernées ;
- Les consommables et/ou matériel de prélèvement (tenue, gants, SHA, flacons...) : fournis par le laboratoire ou à la charge du client ;
- Les certificats d'étalonnage pour le matériel de prélèvement concerné (compteur de particules, aérobiocollecteur).

Les mesures de sécurité

Le prestataire présente dans son offre une note indiquant les mesures prévues pour assurer l'hygiène et la sécurité de son personnel au cours des investigations de terrain. La sécurité de l'intervention des entreprises extérieures est réglementée.

Le préleveur, formé/habilité, s'informe, pendant le contact préliminaire et/ou au début de l'opération de prélèvement proprement dite, des consignes d'hygiène et sécurité dans le service où il intervient et il s'engage à les respecter.

Résultats

Le CCTP prévoit les niveaux cibles pour définir la conformité des résultats : ils sont soit issus de la réglementation (si elle existe) soit définis, en accord avec le prestataire, en fonction des recommandations ou des données de la littérature.

Le CCTP précise que le client :

- exige que le compte rendu des résultats (rapport d'essai) reprenne l'identification complète du point mentionné au plan de prélèvement, les conditions du prélèvement (au repos, en activité, 1^{er} jet...) et les anomalies constatées (il est souhaitable de demander la transmission d'un rapport dans le cadre de l'appel d'offres pour juger de son contenu) ;
- exige la confidentialité des résultats, prévoit les destinataires exclusifs et le mode d'envoi des résultats ;
- exige d'être averti de la nature d'anomalie(s) détectée(s) lors des prélèvements (température, teneur en chlore, couleur...) et lors des analyses (résultats non conformes...) sans attendre le compte-rendu définitif des résultats et prévoit qui est destinataire de l'alerte, comment elle est effectuée (mail, téléphone...) et comment elle est tracée ;
- demande l'engagement du prestataire à réaliser la totalité des analyses sans sous-traitance, sauf exceptionnellement et, si nécessaire, uniquement avec un laboratoire avec lequel il a contractualisé. En cas de sous-traitance d'analyses, le sous-traitant doit respecter les mêmes critères de compétence que le prestataire (ex. : accréditation, ...) et le prestataire doit s'assurer de la conformité des analyses effectuées avant de remettre les résultats au client ; le titulaire du marché a, de toute façon, obligation de déclarer ses sous-traitants ;
- demande au prestataire que les souches à conserver (ex : investigation d'épidémies...) le soient pendant au moins 3 mois. Pour les légionelles, la durée de conservation des souches est au minimum d'1 an ;
- demande au prestataire de transmettre le cas échéant les souches au laboratoire de référence désigné suivant une procédure préétablie.

Durée du contrat

La durée du contrat est précisée.

Les modalités de reconduction ainsi que les modalités de révision des tarifs sont définies.

Les modalités de résiliation sont précisées (ex : résilié par l'un ou l'autre des parties avec un préavis d'un mois par lettre recommandée avec accusé de réception).

Les modalités d'avenant au contrat sont anticipées si de nouveaux contrôles sont à réaliser (nouveau bâtiment...)

Le marché doit aussi indiquer la nature et le montant des pénalités encourues.

Synthèse des éléments spécifiques en fonction des contrôles

Dans tous les cas

- Éviter l'inflation des analyses ;
- Prévoir une fiche de prélèvement établie ou, au minimum validée, par le client ;
- Etablir les valeurs des niveaux cibles quand elles ne sont pas prévues par la réglementation ou les recommandations et, si besoin, des niveaux alertes et actions pour l'interprétation ;
- Veiller à ce que l'EOH soit destinataire des résultats ainsi que les services concernés (de soins, techniques...à préciser suivant l'organisation) ;
- Prévoir un système d'alerte en cas de résultats non conformes en particulier si les résultats impliquent une action corrective rapide :
 - alerter la (les) structure(s) responsable(s) (désignée(s) au préalable de façon concertée,
 - ne pas attendre la version écrite des résultats ;
- Veiller à ce que les souches à conserver le soient pendant le temps prévu au contrat.

Contrôles particulières et microbiologiques de l'air	- Mentionner pour un contrôle particulière, si les mesures de pression différentielle, de vitesse du flux d'air et d'intégrité du filtre doivent être effectuées ; - Préciser le référentiel que devra utiliser le prestataire (ex : normes NF EN ISO 14644-1 pour le comptage particulière, 14644-2 pour la surveillance, 14644-3 pour les autres essais physiques, norme NF EN ISO 14698 pour la microbiologie, bonnes pratiques de thérapie cellulaire ...) ; - Demander que soit mentionné dans le compte rendu : centrale de traitement d'air en marche ou en veille, heure du prélèvement, temps de repos de la salle, différentiel de pression salle-extérieur, présence humaine...). Contrôle particulière de l'air ▪ préciser les caractéristiques du compteur utilisé et demander un certificat d'étalonnage ≤ 1 an, ▪ indiquer variables devant figurer dans le rapport (ex : tailles des particules : 0,5 μm et 5 μm, localisation des prélèvements, ...), ▪ demander, si besoin, les résultats bruts du comptage (tickets). Contrôle microbiologique de l'air ▪ préciser les caractéristiques du biocollecteur utilisé et demander un certificat d'étalonnage ≤ 1 an, ▪ préciser, si ce n'est pas dans le référentiel, le type de milieux de culture, la température et la durée d'incubation à utiliser, ▪ indiquer les variables devant figurer dans le rapport (localisation et heure du prélèvement, temps de repos de la salle, présence humaine...).
Contrôles microbiologiques de l'eau	- Préciser ▪ les catégories d'eau concernées : eau (boisson, soins, piscine, balnéothérapie), ▪ les traitements (désinfectants, produits anti-corrosion...), ▪ préciser pour la potabilité (eau froide, eau chaude mitigée), si le point est à désinfecter ou non, si les tests de terrain sont adaptés au désinfectant, le dosage ou % du thiosulfate... et prévoir de laisser un double de la fiche de prélèvement ou d'effectuer une transmission par mail à la personne désignée, ▪ les analyses à effectuer pour chaque catégorie, voire pour chaque point de prélèvements (ex : FAR à 22°C, FAR à 36°C, autres micro-organismes...), ▪ le référentiel à utiliser ou les milieux de culture utilisés, les températures et les durées d'incubation souhaitées. - Prévoir ▪ thermomètre étalonné avec indication de l'erreur de la sonde, • flaconnage en précisant : le fournisseur (prestataire ou client), le volume, la stérilité, ▪ éventuellement des fiches d'identité des points à prélever. Pour la recherche de Legionelles sous accréditation : s'assurer que le laboratoire est bien accrédité pour ce paramètre.
Contrôles microbiologiques des surfaces	- Préciser clairement l'objectif (démarche qualité, investigation, démarche pédagogique...) ; - Préciser la méthode de prélèvement et /ou le référentiel ainsi que les modalités de prélèvements : en activité, au repos ; empreintes gélosées, écouvillons... ; - Pour un suivi comparatif pendant une campagne de prélèvements, conserver les mêmes points et la même méthodologie de prélèvement ; - Préciser les principes actifs des produits désinfectants utilisés pour prévoir le milieu de culture adapté pouvant en limiter l'effet inhibiteur.
Contrôles microbiologiques en endoscopie	- S'assurer de la compétence du prestataire, notamment s'il est en charge des prélèvements ; - S'assurer que le prélèvement sera effectué par du personnel formé ayant une bonne connaissance du matériel à prélever et des techniques de prélèvements ; - Préciser les modalités de prélèvements : traitement du DM, circonstances (surveillance, maintenance...), durée et conditions de stockage.

Figure 5 : Eléments spécifiques du CCTP en fonction des contrôles

Tableau 1 : Liens hypertextes par thème				
GENERALITES (communes aux 4 thèmes)	Chapitre 1 Stratégie (p 17)	Chapitre 3 Prélèvement (p 41)	Chapitre 4 Analyse (p 720)	Chapitre 5 Interprétation (p 84)
AIR	Stratégie (p 21)	Prélèvement CP (p 45) Aerobio (p 50)	Analyse (p 73)	Interprétation (p 86)
EAU	Stratégie (p 25)	Prélèvement (p 54)	Analyse (p 75)	Interprétation (p 90)
SURFACES	Stratégie (p 28)	Prélèvement (p 60)	Analyse (p 78)	Interprétation (p 92)
ENDOSCOPES	Stratégie (p 31)	Prélèvement (p 64)	Analyse (p 81)	Interprétation (p 95)

Chapitre 3

Le prélèvement

Prérequis

Recommandations générales

- Le prélèvement est un acte essentiel qui conditionne la validité et la représentativité de toutes les analyses qui seront effectuées sur l'échantillon. Une erreur de manipulation peut influencer les résultats d'analyses.
- Il est indispensable avant d'effectuer le prélèvement :
 - de posséder le plan de prélèvements établi et validé par l'EOH et/ou l'institution (CLIN...),
 - d'établir la liste des paramètres d'analyses,
 - de connaître les exigences spécifiques en matière de consignes pratiques et de s'y conformer (volume, flaconnage, conditionnement, ...),
 - de vérifier les critères de conservation et de préservation des échantillons,
 - de vérifier le délai maximal d'acheminement²⁵ au laboratoire avant l'analyse (concertation avec le laboratoire),
 - de s'assurer d'avoir le matériel nécessaire en conformité avec le protocole de(s) l'analyse(s) à effectuer²⁶.
- Le préleveur formé ou mieux « habilité²⁷ » doit procéder de manière à éviter toute contamination de l'échantillon. Il doit connaître et respecter les consignes d'hygiène et sécurité de la zone dans laquelle il intervient (habillage...) ainsi que celles destinées à assurer sa protection (port de gants, masque, vêtements de protection,...).
- La méthode de prélèvement est standardisée pour la surveillance de routine : effectuée toujours par les personnes spécialement formées, avec le même appareil, les mêmes modalités de prélèvements.

Domaine d'application et personnel concerné

- Ce document prend en compte les prélèvements :
 - d'air : pour le comptage particulaire et le contrôle microbiologique,
 - d'eau (y compris dialyse), des surfaces et d'endoscopie : pour le contrôle microbiologique ;
- Les préleveurs sont du personnel soit :
 - de l'établissement : désignés nominativement, formés ou mieux habilités par le laboratoire qui est responsable du pré analytique (notification faite sur la fiche de poste),
 - d'entreprises extérieures, répondant à un cahier des charges validé par le laboratoire en charge de l'analyse en lien avec l'EOH et/ou l'institution (CLIN ...) ;

Remarque : L'accréditation COFRAC pour le prélèvement (mentionnée pour les légionelles, dans l'arrêté de 2010 « reconnaît la compétence de l'organisme à mener l'opération conduisant à l'obtention de l'objet d'essai », mais un laboratoire ne peut être accrédité pour l'échantillonnage (LAB REF02 2015) :

- * s'il sous-traite systématiquement cette opération,
- * s'il ne fait qu'établir le plan de prélèvement sans exécuter lui-même l'opération de prélèvement.

- Les préleveurs s'engagent :
 - à prélever hors de tout conflit d'intérêt²⁸ avec l'établissement où sont réalisés les prélèvements,
 - à respecter les règles d'hygiène et de sécurité afférentes au lieu du prélèvement et au prélèvement lui-même (procédure d'accès, habillage, hygiène des mains...),
 - à respecter les règles de confidentialité quant aux lieux prélevés (conformément au cahier des charges),
 - à compléter la fiche de prélèvement et à respecter les conditions et délais d'acheminement,
 - à informer dans les plus brefs délais le référent de l'établissement en cas d'anomalie constatée.

Traçabilité

Une traçabilité complète des opérations de prélèvements assure la validité de celles-ci et permet la validation et l'interprétation ultérieure des résultats de l'analyse.

Tous les échantillons doivent être clairement identifiés au moment du prélèvement.

La fiche de prélèvement permet de tracer les opérations au cours du prélèvement (figure 6).

²⁵ Délai d'acheminement : le délai entre le prélèvement et l'analyse comprend le transport, l'enregistrement et le traitement en laboratoire.

²⁶ Certificat étalonnage, date de péremption, validation des consommables...

²⁷ Habilité : personne possédant les qualifications requises, les compétences nécessaires et reconnue par son responsable fonctionnel, capable d'accomplir les tâches qui lui sont confiées.

²⁸ Conflit d'intérêts : situation dans laquelle une personne employée par un organisme public ou privé possède, à titre privé, des intérêts qui pourraient influencer ou paraître influencer sur la manière dont elle s'acquitte de ses fonctions et des responsabilités qui lui ont été confiées par cet organisme.

Renseignements communs	- Nom et adresse de l'organisme responsable de la mesure, - Date et heure du prélèvement, - Type de prélèvement, - Localisation du prélèvement (Identification claire de l'emplacement de prélèvement : fiche identité du point de prélèvement, codes-barres, codes de géolocalisation...) et nombre d'échantillon(s) prélevé(s) par point, - Identification du matériel utilisé, - Identification des échantillons prélevés, - Identification du préleveur ayant réalisé le prélèvement, - Résultats des mesures sur site (pour l'eau : température, chlore libre, total), - Toute information sur des conditions particulières lors du prélèvement : remarque(s) ou anomalie(s)²⁹ lors de la réalisation des prélèvements, - Fiche d'envoi au laboratoire : ▪ la date et heure de l'envoi, ▪ les conditions de transport, ▪ les références des échantillons prélevés ; nombres et types de flacons ; - Visa du client le cas échéant.
Air	Renseignements généraux - Critères de classification de la zone ; Référence normative si qualification ou requalification, - État de fonctionnement : relevé des pressions différentielles (ou résultats du test de la feuille si aucun moyen de mesure), - Modalités de prélèvements : ▪ hors activité (salle au repos) : • bionettoyage effectué, • salle au repos, inoccupée depuis (au minimum depuis 3 CP_{0,5} quand il est connu ou au moins 1 heure), • portes fermées, • en présence ou non du préleveur. ▪ en activité : • nombre de personnes présentes Comptage particulière - Appareil utilisé et date du dernier étalonnage, - Tailles particulières prises en compte, - Volume prélevé. Aérobiocontamination - Appareil utilisé et date du dernier étalonnage, - Volume prélevé, - Milieu(x) utilisé(s).
Eau	Prélèvement : - Typologie : point technique, amont du point d'usage, point d'usage..., - Pour un relevé de température d'eau, les informations à préciser sont : ▪ indication si l'eau est mitigée ou pas (il faut demander aux services techniques), ▪ mesure du temps de montée en température avant stabilisation et valeur stabilisée, ▪ présence de variations de température « anormales » pendant la mesure (ex : train d'eau froide dans l'eau chaude, chute de la température de l'eau chaude au bout de quelques minutes). - Conditions : ▪ à distance d'un cycle de désinfection, ▪ avec ou sans purge, ▪ avec ou sans désinfection du point de prélèvement, ▪ 1^{er} jet, 2^{ème} jet, ▪ avec ou sans élément terminal... (brise jet, filtre terminal...). - Toute information sur des conditions particulières lors du prélèvement (état de l'installation, fuites ...).
Surfaces	- Critères de classification de la zone, - Traitement d'air en fonctionnement ou non (si besoin), - Matériel utilisé : écouvillons, géloses contact..., - Technique (poids, applicateur, ...), - Prélèvements : ▪ Localisation (plan d'échantillonnage), ▪ Conditions : avant ou après nettoyage et/ou désinfection, ▪ Modalités de prélèvements : • hors activité (salle au repos) : • bionettoyage effectué, • salle au repos, inoccupée depuis au minimum depuis 3 CP_{0,5} quand il est connu ou au moins 1 heure, • portes fermées, • en activité : • nombre de personnes présentes.
Endoscopes	- Identification de l'endoscope (famille et numéro : ex n° de série de préférence), - Identification du prélèvement : tous canaux ou canal par canal, - Moment du prélèvement (durée et mode de stockage ou autre circonstance à préciser), - Désinfection manuelle ou automatisée et le cas échéant l'identification du laveur-désinfecteur utilisé et préciser le délai depuis la fin de la procédure de désinfection, - Cycle utilisé : désinfection, nettoyage désinfection, - Le volume injecté : le volume recueilli sera évalué au moment du traitement de l'échantillon au laboratoire.

Figure 6 : Eléments de la fiche de prélèvement

²⁹ Anomalie : écart par rapport à la normale ou à la description habituelle point de prélèvement ou de la zone où il est situé

Tableau 1 : Liens hypertextes par thème				
GENERALITES (communes aux 4 thèmes)	Chapitre 1 Stratégie (p 17)	Chapitre 3 Prélèvement (p 41)	Chapitre 4 Analyse (p 720)	Chapitre 5 Interprétation (p 84)
AIR	Stratégie (p 21)	Prélèvement CP (p 45) Aerobio (p 50)	Analyse (p 73)	Interprétation (p 86)
EAU	Stratégie (p 25)	Prélèvement (p 54)	Analyse (p 75)	Interprétation (p 90)
SURFACES	Stratégie (p 28)	Prélèvement (p 60)	Analyse (p 78)	Interprétation (p 92)
ENDOSCOPES	Stratégie (p 31)	Prélèvement (p 64)	Analyse (p 81)	Interprétation (p 95)

Air : Comptage particulaire

Principe

La recherche de particules dans l'air est effectuée avec un compteur optique de particules. Le prélèvement est réalisé par aspiration de l'air en flux régulier et les particules sont mesurées une à une par un faisceau laser (tube laser ou diode laser).

Fréquence

La fréquence (rapportée dans les tableaux 5 et 6) est définie, pour chaque établissement de santé, en fonction de l'objectif et de l'étude de risque :

- pour les requalifications : le comptage particulaire est une des mesures requises pour la requalification d'une ZEM qui inclut au préalable de vérifier un certain nombre de paramètres aéraulique (pressions, débit / vitesse de l'air, taux de brassage...). La fréquence est fixée par les textes normatifs ou la réglementation (ex : Bonnes pratiques de thérapie cellulaire⁽¹²⁾) ;
- pour les contrôles « de routine » : la fréquence est définie en fonction de l'analyse de risque, de la réglementation et, quand elles existent, des recommandations spécifiques. Cette analyse de risques interne à l'établissement (réalisée avec les services techniques, l'EOH et/ou le CLIN) est basée sur le niveau initial de qualification de la salle, le type d'activités pratiquées en routine...

Points particuliers : le choix de la fréquence est fonction :

- pour les blocs : de la classe et du type d'interventions pratiquées,
- pour les chambres de greffés : des pathologies traitées et de la qualification des locaux.

Tableau 5 : Fréquences « optimales » des comptages particuliers à effectuer en salles d'opération et en chambres à environnement maîtrisé en ES

Zone	Classe ISO	Fréquence conseillée « en routine » * au repos	Fréquence des requalifications	Référentiels
Salles d'opération	5,6 ³⁰ et 7	Trimestrielle	Annuelle	NF S 90-351(2013) NF EN ISO 14644-1 et 2 (2016), Guide CTINILS 2002 ⁽¹⁾
	8	Annuelle	Et	
Chambres à environnement maîtrisé (neutropéniques, greffés...)	5, 6 et 7	Trimestrielle	suite à tous travaux susceptibles d'impacter les conditions environnementales de la ZEM (travaux, changement de filtre terminal,...)	

* En l'absence de fréquences définies par les normes ou les recommandations, les fréquences ci-dessus sont données à titre indicatif par le groupe de travail. Il convient de les adapter en fonction de l'analyse de risque effectuée au sein de chaque établissement.

Remarque : Dans les établissements hospitaliers, il est souvent difficile de réaliser les contrôles des chambres en ZEM « au repos » car elles sont rarement inoccupées. On peut donc prévoir d'effectuer des contrôles « en occupation ». Si on choisit des moments où il y a le moins d'activité et le moins de personnes présentes (le patient ± le préleveur) on peut conserver comme valeur attendue celle prévue au repos. Il sera obligatoire de reporter ces conditions particulières sur le rapport d'essai (compte rendu) pour en tenir compte si besoin lors de l'interprétation des résultats.

³⁰ La classe particulaire ISO 6 n'est pas spécifiée dans les recommandations pour les ES

Tableau 6 : Fréquence « optimales » des comptages particuliers à effectuer en stérilisation, pharmacie et thérapie cellulaire

Zone		Classe ISO ou classe de risque des bonnes pratiques	Fréquences minimales issues de la réglementation ou des recommandations		Fréquences conseillées en « routine »*		Fréquences de requalification	Référentiels
			Au repos	En activité	Au repos	En activité		
Stérilisation ³¹	Conditionnement	8	Annuelle	-	Semestrielle à annuelle	-	Annuelle**	Circulaire du 20 octobre 1997, BPPH, 2001 ⁽¹⁰⁾
	Sortie stérile (si ZAC)	8	Annuelle	-	Semestrielle à annuelle	-	Annuelle**	AFS, 2005 ⁽¹¹⁾
	Stockage (si ZAC)							
Pharmacie (ZAC)		A ³² , B	Régulièrement	Fréquemment	Trimestrielle à semestrielle	A définir suite à l'analyse de risque de chaque processus de préparation	Fréquence à définir par les utilisateurs en fonction des caractéristiques de la ZAC suivant les BPP	BPP 2007 ⁽¹³⁾ BPF 2014 ⁽¹⁶⁾ NF EN ISO 14644-1 et 2 (2016)
		C, D			Semestrielle à annuelle			
Thérapie cellulaire, banque de tissus (ZEM)		A et B	Semestrielle	Semestrielle	Semestrielle	Semestrielle	Annuelle pour certains critères, tous les 2 ans ou en fonction de l'analyse de risque pour d'autres (cf. tableau 26)	Décision 27 octobre 2010 ⁽¹²⁾
		C et D	Annuelle	Annuelle	Annuelle	Annuelle		

* En l'absence de fréquences définies par les normes ou les recommandations, les fréquences ci-dessus sont données à titre indicatif par le groupe de travail. Il convient de les adapter en fonction de l'analyse de risque effectuée au sein de chaque établissement.

** Et suite à tous travaux susceptibles d'impacter les conditions environnementales de la ZAC (par ex. interventions sur gaines, moteur, programmation, changement de filtre terminal...).

Moment du prélèvement

Les prélèvements sont effectués :

- pour les prélèvements hors activité (salle au repos) :
 - bionettoyage effectué,
 - salle au repos, zone inoccupée depuis au minimum depuis 3 CP_{0,5} quand il est connu ou au moins 1 heure,
 - portes fermées,
 - en présence du préleveur ou non (départ différé du compteur de particules qui permet au préleveur de sortir de la zone est préférable pour ce contrôle à condition de ne pas créer de mouvement d'air lors de la sortie...);
- pour les prélèvements en activité (pharmacie, stérilisation, thérapie cellulaire) :
 - dans les conditions normales (optimales) d'utilisation et d'occupation des locaux : il convient d'en tenir compte pour l'interprétation des résultats.

³¹ Pour la stérilisation, la zone conditionnement doit être en ISO 8 (BPPH⁽¹⁰⁾). L'AFS⁽¹¹⁾ propose d'étendre cette classe ISO 8 à la zone de sortie stérile mais ne se positionne pas sur la zone de stockage stérile.

³² En établissement de santé la classe A n'est pas demandée dans un local en entier mais uniquement sous des équipements à flux laminaire comme les hottes, PSM et les plafonds soufflants.

Matériel

Compteur de particules préalablement nettoyé-désinfecté avec certificat d'étalonnage en cours de validité (étalonnage au moins annuel).

Réalisation du prélèvement

Respecter les règles d'hygiène et de sécurité afférentes au lieu du prélèvement et au prélèvement lui-même (procédure d'accès, habillage, hygiène des mains, désinfection du matériel...).

Préalables

- Vérifier que l'installation à contrôler est fonctionnelle :
 - centrale de traitement d'air (CTA) en marche,
 - affichage des manomètres vérifié (différentiel de pressions),
 - ou, à défaut, test de la feuille effectué (aspiration d'une feuille de papier par les bouches de reprise d'air, feuille repoussée par les bouches de soufflage),
 - Reporter sur la fiche de prélèvement.

Réalisation des mesures

- Réaliser une désinfection des mains par friction,
- Revêtir la tenue conforme à la zone (ex. : ensemble tunique pantalon, masque chirurgical, charlotte, sabots...),
- Positionner le compteur de particules sur une surface plane (ex. chariot, table...) ou sur le trépied fourni avec l'appareil préalablement nettoyé-désinfecté : (NF EN ISO 14644-1 et 2 (2016)) :
 - sonde face au flux en écoulement unidirectionnel et à hauteur de l'activité,
 - sonde vers le haut en écoulement non unidirectionnel, à hauteur de l'activité et non situé sous une bouche de ventilation ;
- Penser à la position du préleveur :
 - soit sortir calmement de la pièce (départ différé, déclenchement à distance),
 - soit se tenir immobile dans la pièce près d'une bouche de reprise (figures 7 et 8) ;



Figure 7 : Exemple de position du préleveur quand il ne peut pas sortir de la salle dans une chambre en environnement maîtrisé

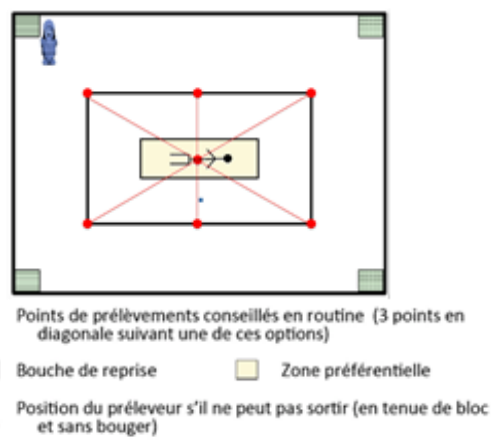


Figure 8 : Exemple de position du préleveur quand il ne peut pas sortir de la salle dans une salle d'opération et exemple de positionnement des points de prélèvements lors des contrôles de routine suivant la norme NF S 90-351 (2013)

- Réaliser le comptage suivant les recommandations du fabricant en respectant le plan d'échantillonnage pré-établi (figure 8) ;
- Attendre si nécessaire que le niveau de particules se stabilise pour commencer la mesure ;

- Mesurer au minimum la quantité de particules $\geq 0,5 \mu\text{m}$:
 - si on mesure plus d'une taille, chaque taille doit être au moins 1,5 fois supérieure à celle qui précède (par exemple pour $0,5 \mu\text{m}$ cela ferait : $0,5 \times 1,5$ soit $0,75\dots$) ;
 - les tailles de $0,5$, 1 et $5 \mu\text{m}$ sont demandées par les bonnes pratiques de stérilisation ^{(10) (11) (13)} ;
 - pour la classe ISO 5 : les limites de l'échantillonnage et de l'exploitation statistique des résultats rendent inappropriés la mesure des particules de taille $\geq 5 \mu\text{m}$ du fait de leur faible quantité dans cette classe de risque ;
- Pour les contrôles de routine :
 - le groupe de travail recommande d'utiliser le plan d'échantillonnage proposé dans la norme NF S90-351 (2013) (figure 8) c'est-à-dire 3 points en diagonale dans la zone proche du patient ou de l'activité incluant la zone la plus critique pour l'activité à protéger. Ce plan d'échantillonnage est à adapter en fonction de l'analyse de risque ;
 - les volumes élémentaires ne peuvent pas toujours être respectés en routine notamment en fonction du modèle de compteur particulaire utilisé (ex : compteur de faible débit $2,83 \text{ L/min}$). Dans ce cas le prélèvement ne permet pas de déclarer une conformité par rapport à une classe ISO mais il peut permettre de détecter une dérive par rapport aux valeurs habituellement trouvées avec ce compteur ;
- Pour les qualifications ou requalifications :
 - utiliser un compteur de particules conforme à la norme ISO 21501-4 (2007)³³ en respectant les volumes élémentaires³⁴ calculés ;
 - respecter le plan d'échantillonnage établi en fonction de la surface de la salle conformément à la norme NF EN ISO 14644-1 et 2 (2016) :
 - * respecter au minimum le nombre de points requis³⁵ (tableau 7),
 - * diviser l'ensemble de la zone en secteurs de superficie égale,
 - * sélectionner dans chaque secteur un point représentatif des caractéristiques du secteur (figure 9),
 - * à chaque emplacement choisi, positionner la sonde du compteur de particules au niveau de la zone de travail,
 - échantillonner chaque point au moins 1 fois ; si plusieurs échantillons sont réalisés pour le même point, seule la moyenne doit être prise en compte ;
 - respecter pour chaque prélèvement le volume minimal de 2 L et le temps minimal de 1 minute pour chaque prélèvement.

Tableau 7 : Exemples du nombre minimal de points à prélever en fonction de la surface de la salle lors d'une qualification ou requalification (d'après la norme NF EN ISO 14644-1 et 2 (2016), table non exhaustive)

Surface de la salle en m^2	Nombre minimal de points à prélever (N)
2	1
6	3
10	5
36	9
52	10
104	16
1000	27
> 1000	$N = 27 \times \frac{A}{1000}$ $A = \text{surface de la salle en } \text{m}^2$

³³ Seuls les compteurs répondant à la norme ISO 21501-4 permettent d'effectuer des prélèvements conformes aux normes NF EN ISO 14644. Les autres ne permettent en aucun cas de valider une classe ISO et les résultats sont rendus « bruts » (valeurs obtenues par points contrôlés) ; ils peuvent toutefois être utiles pour détecter une dérive de ces valeurs brutes par rapport à un tableau de bord préalablement établi avec les mesures antérieures de la zone contrôlée.

³⁴ CP 0,5 : Classe de cinétique d'élimination des particules, particules de $0,5 \mu\text{m}$

Volume élémentaire de l'échantillon en chaque point : Il est calculé selon la formule suivante et doit être au minimum de 2 L et de 1 minute (norme ISO/DIS 14644-1 (2014)) : $V_s = \frac{20}{C_{n,m}} \times 1000$

V_s = volume élémentaire minimal, en litres, prélevé en chaque point ; $C_{n,m}$ = limite de classe (en nombre de particules par m^3) pour la plus grande taille particulaire prise en compte dans la classification visée ; 20 = nombre de particules qui pourrait être compté si la concentration particulaire était celle de la limite de classe.

³⁵ Nombre de points minimal calculé qui garantit, avec au moins 95 % de confiance, qu'au moins 90 % de la surface de la salle propre ne dépasse pas les limites de la classe.

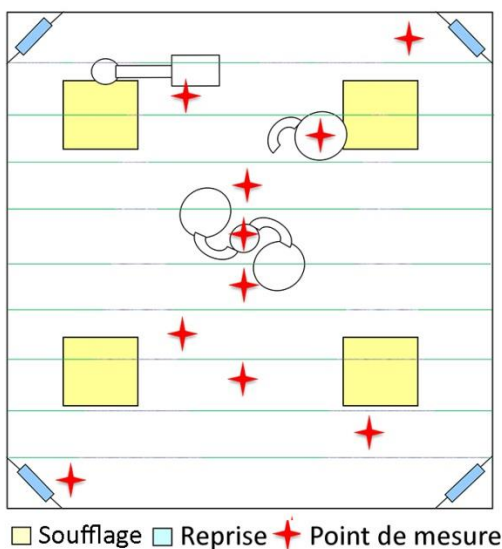


Figure 9 : Exemple de localisation des 10 points de prélèvements choisis pour une salle ISO 7 de chirurgie viscérale de 38 m² suivant la norme NF EN ISO 14644-1 et 2 (2016)

Traçabilité et identification du prélèvement

- Compléter la fiche de prélèvement,
- Conserver les données issues du compteur suivant les modalités d'archivage du laboratoire et/ou la réglementation éventuellement applicable aux locaux (recours judiciaire par exemple pour les blocs opératoires...).

Remarque : Le ticket de l'imprimante du compteur à particules peut s'effacer dans le temps. Il est souhaitable de le scanner / photocopier.

Tableau 1 : Liens hypertextes par thème				
GENERALITES (communes aux 4 thèmes)	Chapitre 1 Stratégie (p 17)	Chapitre 3 Prélèvement (p 41)	Chapitre 4 Analyse (p 720)	Chapitre 5 Interprétation (p 84)
AIR	Stratégie (p 21)	Prélèvement CP (p 45) Aerobio (p 50)	Analyse (p 73)	Interprétation (p 86)
EAU	Stratégie (p 25)	Prélèvement (p 54)	Analyse (p 75)	Interprétation (p 90)
SURFACES	Stratégie (p 28)	Prélèvement (p 60)	Analyse (p 78)	Interprétation (p 92)
ENDOSCOPES	Stratégie (p 31)	Prélèvement (p 64)	Analyse (p 81)	Interprétation (p 95)

Air : Contrôle microbiologique : aérobiocontamination

Principe

La recherche de bactéries, levures, champignons est effectuée le plus souvent à l'aide de biocollecteurs. Généralement, le prélèvement est basé sur le principe de l'impaction directe sur gélose : l'air est aspiré en flux régulier et canalisé vers la surface de la gélose à travers une tête perforée ou crible.

Fréquence

La fréquence (tableaux 8 et 9) est définie pour chaque établissement de santé en fonction de l'objectif et de l'étude de risque :

- **pour les qualifications/requalifications** : La fréquence est précisée dans la norme NF S90-351, ou dans les recommandations spécifiques à l'activité, en fonction de la classification du local ou de la zone à contrôler. Les qualifications et requalifications doivent être effectuées par un prestataire compétent en microbiologie et/ou sous-traitant avec un laboratoire de microbiologie environnementale ;
- **pour la surveillance « de routine »** : La fréquence est définie en fonction de l'analyse de risque, de la réglementation (ex : bonnes pratiques de thérapie cellulaire ⁽¹²⁾) et, quand elles existent, des recommandations spécifiques. Cette analyse de risques interne à l'établissement (réalisée avec les services techniques, l'EOH et le CLIN) est basée sur le niveau initial de qualification de la salle, du type d'activités pratiquées en routine...

Tableau 8 : Fréquence « optimale » des prélèvements d'aérobiocontamination pour les salles d'opération et les chambres en environnement maîtrisé en ES

Zone	Fréquence conseillée « en routine »*	Fréquence requalification	Référentiels
Salles d'opération	Trimestrielle à semestrielle (et plus si travaux à proximité ou après travaux dans la salle sans modification du système de traitement de l'air)	Annuelle Et suite à tout travaux susceptibles d'impacter les conditions environnementales de la ZEM (travaux, changement de filtre terminal,...)	NFS 90-351 (2013), NF EN ISO 14698 (2004)
Chambres en environnement maîtrisé (neutropéniques, greffés...)			

* en l'absence de fréquences définies par les normes ou les recommandations, les fréquences ci-dessus sont données à titre indicatif par le groupe de travail. Il convient de les adapter en fonction de l'analyse de risque effectuée au sein de chaque ES.

Remarque : dans les établissements hospitaliers, il est souvent difficile de réaliser les contrôles des chambres en environnement maîtrisé « au repos » car elles sont rarement inoccupées. On peut donc prévoir d'effectuer des contrôles « en occupation ». Si on choisit des moments où il y a le moins d'activité et le moins de personnes présentes (le patient ± le préleveur) on peut conserver comme valeur attendue celle prévue au repos. Il sera obligatoire de reporter ces conditions particulières sur le rapport d'essai (compte rendu) pour en tenir compte si besoin lors de l'interprétation des résultats.

Tableau 9 : Fréquence « optimale » des prélèvements d'aérobiocontamination pour la stérilisation, la pharmacie et la thérapie cellulaire

Zones		Fréquence « minimale » issue des recommandations : En activité *	Fréquence « en routine » **		Fréquence requalification	Référentiels
			Au repos	En activité		
Stérilisation	Conditionnement	Semestrielle	Trimestrielle à semestrielle	Trimestrielle à semestrielle	Annuelle Et suite à tous travaux susceptibles d'impacter les conditions environnementales de la ZEM (travaux, changement de filtre terminal,...)	AFS ⁽¹¹⁾ , NF S90-351 (2013), BPPH ⁽¹⁰⁾ , BPP ⁽¹³⁾ , BPF ⁽¹⁶⁾ , NF S90-351 (2013),
	Sortie stock stérile (si ZAC)					
	Stock stérile (si ZAC)					
Pharmacie (ZAC)	Classe A et B	Fréquemment	Trimestrielle à semestrielle	à définir suite à l'analyse de risque de chaque processus de préparation		
	Classe C et D	Fréquemment	Semestrielle à annuelle			
Thérapie cellulaire	Classes A et B	Trimestrielle	Trimestrielle	Trimestrielle	Annuelle pour certains critères, tous les 2 ans ou en fonction de l'analyse de risque pour d'autres (cf. tableau 26)	Décision du 27 octobre 2010 ⁽¹²⁾
	Classes C et D	Semestrielle	Semestrielle	Semestrielle		

* pas de recommandations « au repos »

** en l'absence de fréquences définies par les normes ou les recommandations, les fréquences ci-dessus sont données à titre indicatif par le groupe de travail. Il convient de les adapter en fonction de l'analyse de risque effectuée au sein de chaque ES.

Remarque : En stérilisation, si on maîtrise l'environnement et en l'absence de travaux de voisinage, une fréquence semestrielle de prélèvement suffit pour la surveillance de l'aérobiocontamination.

Moment du prélèvement

En routine, les prélèvements sont généralement réalisés hors activité. Un échantillonnage hors présence humaine, avant toute activité et après bionettoyage permet d'établir une situation de base et évalue les performances de l'installation.

- Pour les prélèvements « au repos » (hors présence humaine) :
 - le bionettoyage est effectué,
 - la salle est zone inoccupée depuis au minimum depuis 3 CP_{0,5} quand il est connu ou au moins 1 heure,
 - les portes sont fermées,
 - le préleveur est présent ou sorti (départ différé ou déclenchement à distance) ;
- Pour les prélèvements « en activité » (pharmacie, stérilisation, thérapie cellulaire) :
 - dans les conditions normales (optimales) d'utilisation et d'occupation des locaux : il convient d'en tenir compte pour l'interprétation des résultats.

Matériel

- Prélèvement par impaction :
 - biocollecteur (avec certificat d'étalonnage en cours de validité) et tête(s) d'échantillonnage(s) stérilisée(s) ou préalablement nettoyés-désinfectée(s) ;
 - milieux gélosés :
 - * pour quantifier les bactéries : géloses type TSA, R2A, PCA ou autre milieu suivant référentiel,
 - * pour quantifier les champignons filamenteux : milieu type gélose au Malt, de Sabouraud ou autre milieu suivant référentiel,
 - * pour la recherche de micro-organismes spécifiques : milieux choisis en fonction du micro-organisme recherché ou du référentiel quand il existe,
- Prélèvement passif : Boîtes de sédimentation,
- Fiche(s) de prélèvements : pour assurer la traçabilité.

Réalisation du prélèvement

Respecter les règles d'hygiène et de sécurité afférentes au lieu du prélèvement et au prélèvement lui-même (procédure d'accès, habillage, hygiène des mains, désinfection du matériel...).

Prélèvement avec un échantillonneur par impaction (biocollecteur) ³⁶

- Préparation préalable du matériel :
 - réaliser une désinfection des mains par friction avec un produit hydro alcoolique (FHA),
 - déposer les géloses dans un bac fermé préalablement nettoyé-désinfecté avec un détergent désinfectant de surfaces ;
- Sur le lieu de prélèvement :
 - réaliser une désinfection des mains par friction (FHA) ;
 - revêtir une tenue conforme au protocole spécifique d'habillage de la zone concernée (ex. : ensemble tunique pantalon, masque chirurgical, charlotte, sabots...) ;
 - vérifier que l'installation à contrôler est fonctionnelle :
 - * différentiel de pressions (manomètre, affichage électronique...),
 - * à défaut : test de la feuille (aspiration d'une feuille de papier par les bouches de reprise d'air, feuille repoussée par les bouches de soufflage et sous les portes),
 - * reporter sur fiche de prélèvement,
 - réaliser une FHA.

³⁶ D'autres méthodes sont disponibles comme par exemple (annexe 2) :

- échantillonneur par filtration : cette méthode est peu utilisée car plus complexe. En effet, il est nécessaire de s'assurer que les conditions de filtration n'affectent pas la viabilité des micro-organismes recueillis ;
- méthode par barbotage en milieu liquide : les micro-organismes sont aspirés et transférés directement en milieu liquide, ce qui évite le risque de dessiccation de l'échantillon.

- Réalisation du prélèvement :

C'est la méthode la plus couramment utilisée (Figure 10).

Le prélèvement s'effectue à hauteur de l'activité, tête vers le haut :

- réaliser une FHA des mains ;
- nettoyer-désinfecter le biocollecteur positionner le biocollecteur sur une surface plane (ex. chariot, table...) ou sur le trépied fourni avec l'appareil ;
- placer la gélose ouverte dans son logement sur le biocollecteur ;
- poser le couvercle de la gélose (face externe sur le chariot ou la table) ;
- visser la tête d'échantillonnage stérile ou préalablement nettoyées-désinfectées ;
- mettre en marche l'appareil pour régler le volume d'air à prélever (en général 1000 L pour les classes M1 et M10³⁷ (bactéries et fongiques), et 200 ou 500 L pour les zones $\geq$ M100)³⁸ et déclencher le prélèvement, (en fonction des zones, il peut être souhaitable de prévoir des volumes plus faibles pour les recherches de fongiques⁽¹⁷⁾ ;
- sortir de la salle si déclenchement différé ou rester immobile (entre point de prélèvement et bouche de reprise) (figure 10) ;
- à la fin du prélèvement, retirer la boîte, la refermer ;
- identifier le prélèvement et le déposer couvercle vers le bas dans le contenant de transport.

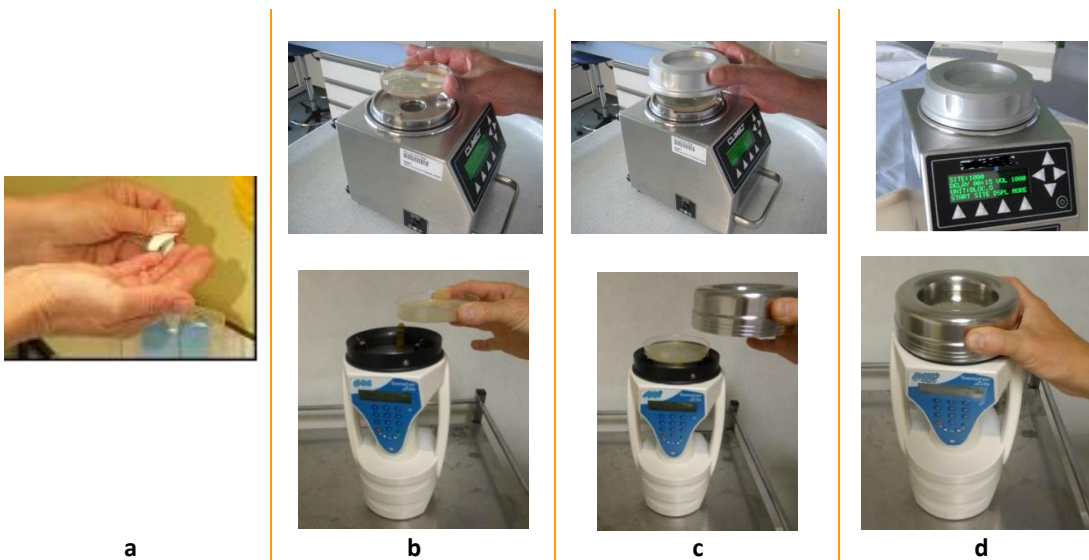


Figure 10 : Illustration d'un prélèvement d'air par impaction. (2 modèles de biocollecteurs)

a : FHA des mains, b : positionnement de la boîte de Pétri,
c : remise en place du crible, d : appareil prêt pour la mesure

- Pour les contrôles de routine :

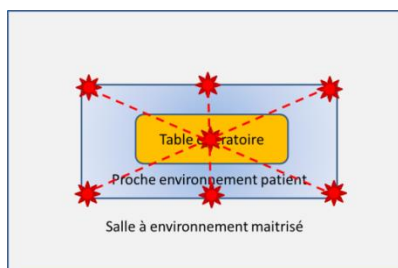
- le groupe de travail recommande d'utiliser le plan d'échantillonnage proposé dans la norme NF S90-351 (2013) (figure 11) c'est-à-dire 3 points en diagonale dans la zone proche du patient ou de l'activité incluant la zone la plus critique pour l'activité à protéger. Ce plan d'échantillonnage est à adapter en fonction de l'analyse de risque ;
- les volumes d'échantillonnage cités ci-dessus doivent être respectés ;

- Pour les qualifications et requalifications :

- utiliser un biocollecteur conforme à la norme NF EN ISO 14698 (2004),
- respecter la méthode décrite dans la norme NF EN ISO 14698 (2004),
- le groupe de travail recommande d'utiliser en support le plan d'échantillonnage de la norme NF S90-351 (2013) et de l'adapter en fonction de l'analyse de risque (figure 12).

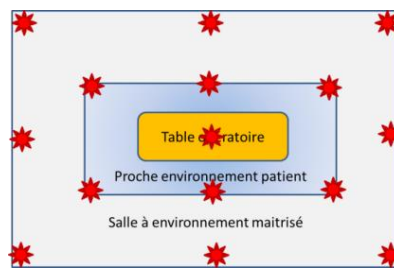
³⁷ Le risque potentiel de dessèchement de la gélose au cours d'un prélèvement de 1000L peut inciter à réaliser 2 prélèvements de 500 L ⁽²⁴⁾

³⁸ L'échantillon doit être prélevé avec un appareil ayant un débit suffisant pour ne pas dessécher le milieu de culture (Ex 100l/min) suivant l'ISO 14698-1



* point de prélèvement

Figure 11 : Représentation schématique des points (3 points en diagonale suivant une des trois options) pouvant être inclus dans un plan d'échantillonnage « en routine » (aérobiocontamination).



* point de prélèvement

Figure 12 : Représentation schématique des points pouvant être inclus dans un plan d'échantillonnage pour une qualification ou requalification (aérobiocontamination).

Remarque : Lors de travaux exposant à un risque de contamination fongique les prélèvements d'aérobiocontamination sont effectués :

- pendant les travaux : dans les zones adjacentes au chantier (voire des zones à risques définies lors de l'étude d'impact),
- à la fin des travaux : au niveau du chantier si une contamination fongique résiduelle représente un risque pour les patients.

Réalisation du prélèvement avec des dispositifs passifs ou boîtes de sédimentation :

Cette méthode peut servir pour évaluer le risque de biocontamination d'une surface ou d'un produit par voie aérienne en déterminant le nombre de particules viables sédimentées sur la boîte en fonction du temps d'exposition (au cours d'une manipulation technique par exemple). L'exposition doit être représentative de l'acte pratiqué. Les géloses doivent être spécifiquement validées pour cette activité (en général le temps d'exposition validé par le fabricant est au maximum de 4 heures). Cette méthode ne peut être pratiquée que quand un biocollecteur ne peut pas être utilisé (ex : isolateur) ou quand elle est recommandée (ex : ESET).

Identification du prélèvement

- Identifier le prélèvement : écrire seulement le numéro d'échantillon en tout petit sur un bord ou sur le fond de la boîte et non sur le couvercle,
- Compléter la fiche de prélèvement.

Conditions de transport et délai d'acheminement

Les conditions de transport des échantillons doivent assurer la survie des micro-organismes collectés :

- assembler les boîtes avec du ruban adhésif ou du parafilm (pour qu'elles ne s'ouvrent pas pendant le transport) ou utiliser des boîtes spécifiques (figure 13),
- positionner les couvercles vers le bas (condensation sur le couvercle),
- ne pas les réfrigérer,
- le délai d'acheminement est au maximum de 24 heures à température ambiante.

Les échantillons doivent être placés dans un conditionnement évitant tout risque de contamination externe.



Figure 13 : Exemple de boîte préparée pour le transport

Tableau 1 : Liens hypertextes par thème				
GENERALITES (communes aux 4 thèmes)	Chapitre 1 Stratégie (p 17)	Chapitre 3 Prélèvement (p 41)	Chapitre 4 Analyse (p 720)	Chapitre 5 Interprétation (p 84)
AIR	Stratégie (p 21)	Prélèvement CP (p 45) Aerobio (p 50)	Analyse (p 73)	Interprétation (p 86)
EAU	Stratégie (p 25)	Prélèvement (p 54)	Analyse (p 75)	Interprétation (p 90)
SURFACES	Stratégie (p 28)	Prélèvement (p 60)	Analyse (p 78)	Interprétation (p 92)
ENDOSCOPES	Stratégie (p 31)	Prélèvement (p 64)	Analyse (p 81)	Interprétation (p 95)

Prélèvement d'eau

Principe

Les contrôles de la qualité microbiologique des eaux ciblent la recherche des micro-organismes susceptibles d'affecter la santé de l'homme soit :

- en recherchant les micro-organismes tels que prévu dans les textes réglementaires ou les recommandations :
 - faciles à mettre en évidence et témoins d'une contamination potentielle par des germes pathogènes (micro-organismes « tests » ou « témoins » d'une contamination microbienne),
 - spécifiques (recherche ciblée) (ex : *Legionella*, *Pseudomonas aeruginosa*...),
- en recherchant des micro-organismes spécifiques dans le cadre d'une investigation.

Fréquence

La fréquence des prélèvements (tableau 10) est :

- soit fixée par le cadre réglementaire (ex : limites et références de qualité pour l'eau potable, niveaux cibles pour *Legionella*),
- soit variable en fonction de l'analyse de risque et de l'objectif du prélèvement et/ou des résultats de l'analyse. En aucun cas elle ne sera inférieure à celle fixée par la réglementation quand elle existe.

Tableau 10 : Fréquences minimales des analyses pour les paramètres microbiologiques en fonction de la typologie des différentes catégories d'eau

Catégorie d'eau	Fréquences issues de la réglementation	Fréquences issues des recommandations et paramètres microbiologiques associés	Référentiels
Q.1. Eaux ne subissant aucun traitement dans l'établissement de santé			
Q.1.1 a Eau d'entrée	Programme analytique de surveillance du réseau public ³⁹	Trimestrielle : FAR à 22°C et à 36°C	Code de la santé publique Arrêté du 21 janvier 2010 Guide de l'eau ⁽¹⁴⁾ Surveillance microbiologique de l'environnement dans les ES ⁽¹⁾
Q.1.1 b Eau à usage alimentaire (aux points d'usage)		Un contrôle par tranche de 100 lits et par an (au minimum 4 par an) : FAR à 22°C et à 36°C, coliformes totaux, <i>P. aeruginosa</i>	
Q.1.2. Eau pour soins standard ⁴⁰ (points d'usage)	-	Fréquence en fonction de la taille de l'ES, des spécificités du réseau et des zones à risque : échantillonnage échelonné sur l'année de points stratégiques représentatifs. : FAR à 22°C et à 36°C, coliformes totaux, <i>P. aeruginosa</i>	Guide de l'eau ⁽¹⁴⁾ Surveillance microbiologique de l'environnement dans les ES ⁽¹⁾
Q.2. Eaux traitées au sein de l'établissement de santé, répondant à des critères définis en fonction des usages alimentaires, sanitaires et de soins.			
Q.2.1. Eau bactériologiquement maîtrisée	-	Trimestrielle ⁴¹ : FAR à 22°C, <i>P. aeruginosa</i> (hors systèmes de microfiltration à UU)	Guide de l'eau ⁽¹⁴⁾
Q.2.2. Eau chaude sanitaire (ECS)	Annuelle (cf tableau 11 p 57 et fiche 1 p 100)		Arrêté du 1 ^{er} février 2010
Q.2.3. Eau des piscines de rééducation	-	Mensuelle ⁴² (hors présence humaine ⁴³) : FAR à 36°C, <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> cf fiche n° 8 page 107	Guide de l'eau ⁽¹⁴⁾ Anses ⁽¹⁸⁾
Q.2.4. Eau des bains à remous et des douches à jets	Annuelle (cf tableau 11 p 57)	Trimestrielle : <i>Legionella</i> Mensuelle : FAR à 36°C, <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> (hors présence humaine)	Arrêté du 1 ^{er} février 2010 Anses ⁽¹⁹⁾
Q.2.5. Eaux pour hémodialyse	cf tableau 14 et 15 page 61		
Q.2.8. Eau des fontaines à usage de boisson	Annuelle	A l'installation Puis une fois par an, (plan d'échantillonnage sur l'année : chaque fontaine est prélevée au moins une fois dans l'année).	Circulaire 30 décembre 1986 Guide de l'eau ⁽¹⁴⁾

³⁹ L'arrêté du 12 février 2007 précise que les analyses de potabilité sont effectuées uniquement par des laboratoires accrédités suivant la norme ISO/CEI 17025 par le Comité français d'accréditation (COFRAC) ou par tout autre organisme d'accréditation équivalent européen signataire de l'accord multilatéral pris dans le cadre de la coordination européenne des organismes d'accréditation pour la réalisation des prélèvements et des analyses des paramètres concernés et agréés par le ministère. L'arrêté du 21 janvier 2010 modifiant l'arrêté du 11 janvier 2007 relatif au programme de prélèvements et d'analyses du contrôle sanitaire pour les eaux fournies par un réseau de distribution, pris en application des articles R. 1321-10, R. 1321-15 et R. 1321-16 du code de la santé publique indique que la fréquence des contrôles sanitaires des eaux destinées à la consommation humaine dépend de la population desservie et du débit (m³/h).

⁴⁰ Lorsque sur un point d'eau, l'eau Q.1.2. est utilisée en mélange avec de l'eau chaude Q.2.2, il est préférable de réaliser le prélèvement sur l'eau mitigée afin de connaître la qualité de l'eau réellement utilisée.

⁴¹ Les systèmes de microfiltration à usage unique ne justifient pas de réaliser des contrôles bactériologiques, une fois que le procédé a été validé et que ses modalités d'utilisation sont régulièrement contrôlées et à condition de ne rajouter aucune connectique non stérile en aval du filtre (audit de pratiques).

⁴² En l'absence de réglementation spécifique relative à la qualité de l'eau des piscines de rééducation fonctionnelle, d'usage exclusivement médical, il est recommandé d'appliquer au minimum les exigences de qualité de l'eau ainsi que les règles d'hygiène et de surveillance régissant les piscines ouvertes au public (Code de la santé publique : articles D.1332-1 à D.1332-15).

⁴³ Le prélèvement est fait hors présence humaine, le matin avant l'accès des patients, pour caractériser le fonctionnement du traitement.

Remarques :

- La glace alimentaire : la glace fait l'objet de dispositions spécifiques dans le règlement n° 852-2004 relatif à l'hygiène des denrées alimentaires. A ce titre, un industriel fabriquant de la glace alimentaire doit respecter les dispositions en matière d'hygiène fixées par le règlement précité. Ainsi, à l'instar des autres entreprises alimentaires, le programme d'analyses de la qualité de l'eau au titre du contrôle sanitaire est désormais établi uniquement dans le cas où l'eau utilisée pour la fabrication de la glace ne provient pas d'une distribution publique⁴⁴.
- La fréquence de surveillance de *Legionella* est réglementée par l'arrêté du 1^{er} février 2010 (Tableau 11). Mais, la seule recherche de *Legionella* ne constitue pas un moyen suffisant de surveillance des installations. La température est un indicateur indirect du risque de leur présence dans les réseaux de distribution d'eau et il est nécessaire de la mesurer régulièrement, voire mieux en continu, en divers points représentatifs des réseaux de distribution d'eau. Pour une optimisation de l'interprétation des recherches de *Legionella*, il est souhaitable de réaliser des campagnes de prélèvements simultanés pour une même distribution et d'augmenter les contrôles dans les zones hébergeant des patients à risques (immunodéprimés...) ou de sécuriser les points de distribution d'eau dans ces secteurs (en particulier douche) par la mise en place de micro filtres terminaux accompagnés de protocoles validés et de contrôles réguliers des modalités d'utilisation.

Tableau 11 : Points de surveillance et fréquences minimales des recherches de *Legionella* dans l'eau chaude sanitaire des établissements de santé d'après l'arrêté du 1^{er} février 2010

Points de surveillance	Fréquence en ES
Fond de ballon(s) de production et de stockage d'eau chaude sanitaire, le cas échéant.	1 fois par an : - dans le dernier ballon si les ballons sont installés en série, - dans l'un d'entre eux si les ballons sont installés en parallèle.
Point(s) d'usage à risque le(s) plus représentatif(s) du réseau et point(s) d'usage le(s) plus éloigné(s) de la production d'eau chaude sanitaire.	1 fois par an
Points d'usage représentatifs situés dans des services accueillant des patients identifiés par le comité de lutte contre les infections nosocomiales (ou toute organisation chargée des mêmes attributions) comme particulièrement vulnérables au risque de légionellose.	1 fois par an
Retour de boucle (retour général), le cas échéant.	1 fois par an

Moment du prélèvement

- Les prélèvements sont planifiés avec le laboratoire et avec le client (établissement de santé) (pour prendre en compte les contraintes de fonctionnement) ;
- Les modalités de prélèvement sont vérifiées si besoin (les sites de prélèvement planifiés sont, en principe, situés dans un environnement propre et facilement accessibles).

Remarque : L'horaire du prélèvement peut influencer les résultats (eau circulante, eau stagnante...). Une fois qu'il sera défini pour chaque point (en fonction des objectifs), cet horaire sera le moins décalé possible dans le temps pour l'ensemble des points planifiés.

Matériel

- Plan d'échantillonnage préétabli et validé (EOH, CLIN, services techniques...) ; fiche de prélèvement ;
- Flacons de prélèvements stériles (remarque : pour les prélèvements par immersion dans des eaux propres, les flacons seront stériles à l'intérieur et stériles ou désinfectés à l'extérieur) :
 - s'assurer que le volume du flacon de prélèvement est adapté à l'analyse des paramètres demandés. Dans la plupart des cas, des flacons de 250 à 500 mL sont suffisants dans la mesure où moins de cinq catégories de micro-organismes sont recherchées, impliquant chacune l'ensemencement d'un volume maximal de 100 mL. Dans certains cas, des volumes plus importants sont nécessaires comme par exemple pour les *Legionella spp.* (au moins 500 mL)⁴⁵, les *Salmonella spp.* (1 litre) ou pour les virus, les kystes de *Giardia*, les oocystes de *Cryptosporidium*, les amibes dans les eaux propres (de 10 à plusieurs centaines de litres sont examinés)⁴⁶ ;
 - s'assurer de la nature du traitement continu de l'eau et de la cohérence avec le neutralisant présent dans les flacons ;
 - s'assurer que le neutralisant n'a pas d'effet sur l'échantillon (eaux traitées par désinfectants) et qu'il est efficace en qualité et quantité (ex : la masse théorique du thiosulfate de sodium nécessaire pour neutraliser 1 mg de chlore est de 7,1 mg) ;

⁴⁴ Circulaire DGS/SD7A n° 2007-39 du 23 janvier 2007 relative à la mise en œuvre des arrêtés du 11 janvier 2007 concernant les eaux destinées à la consommation humaine.

⁴⁵ Volume préconisé par la version du 1^{er} novembre 2014 de la norme 90-431.

⁴⁶ En général, dans le cas des grands volumes prélevés, une étape de concentration est réalisée sur le site au moyen d'un filtre à cartouche qui est ensuite transporté au laboratoire.

- Solution hydro alcoolique ;
- Désinfectant (alcool à 70°C, lingettes pré imprégnées de détergent-désinfectant...) ;
- Chalumeau : à la condition de respecter les règles de sécurité incendie et de vérifier que les dispositifs supportent la chaleur ;
- Stylos, marqueurs, clés, pinces, tournevis... ;
- Sac isotherme, avec glace ou blocs réfrigérants, réfrigérateurs portables ou compartiments réfrigérants dans des véhicules en fonction du délai de transport et du type d'eau prélevée (enregistreur de température si besoin) ;
- Thermomètre étalonné ;
- Si besoin :
 - appareillage de mesure du pH, du chlore, de la turbidité...,
 - entonnoir stérile pour recueil d'eau au 1^{er} jet si flacons à ouverture réduite,
 - canne de prélèvement,
 - chronomètre contrôlé,
 - récipient pour évacuer les eaux de purges...

Remarque : Chaque point de prélèvement peut être doté d'une fiche descriptive pour faciliter le travail du préleveur. Cette fiche « d'identité » du point de prélèvement pourrait indiquer le lieu, le local, la localisation précise du point de prélèvement (plan, photo, géolocalisation...), les conditions d'accès, les prélèvements à réaliser, la nature du traitement de l'eau... et toute autre donnée utile au préleveur.

Réalisation du prélèvement

Règles générales

- Respecter les règles d'hygiène et de sécurité afférentes au lieu du prélèvement et au prélèvement lui-même (procédure d'accès, habillage, hygiène des mains, désinfection du matériel...) :
 - réaliser une désinfection des mains par friction (FHA),
 - revêtir une tenue conforme au protocole spécifique d'habillage de la zone concernée (ex. : ensemble tunique pantalon, masque chirurgical, charlotte, sabots...) ;
- Prélever avec précaution, dans des conditions d'hygiène irréprochables pour le préleveur, le matériel et les flacons (figure 14) :
 - réaliser une FHA des mains,
 - protéger l'échantillon contre les courants d'air et les éclaboussures,
 - placer le flacon ouvert dans l'écoulement d'eau et le remplir dans des conditions aseptiques,
 - pendant le remplissage, l'intérieur du bouchon du flacon ne doit entrer en contact avec aucun élément (doigts, sol, poche, ...),
 - respecter la graduation du flacon (ne pas remplir au-delà de l'épaule pour faciliter l'homogénéisation au moment de la filtration ou de la mise en culture),
 - fermer le flacon immédiatement et homogénéiser le contenu par retournement (répartition du neutralisant),
 - ne pas utiliser cet échantillon d'eau pour la mesure de la température ou autre paramètre mesuré sur site.



a



b



c

Figure 14 : Illustrations de prélèvements d'eau (robinet, douche)

a : friction hydro-alcoolique
 b : prise de température et rinçage/purge
 c : remplissage du flacon

Particularités en fonction de la typologie des points de contrôle :

- Les points techniques (tableau 12) : aval immédiat du compteur, départ et retour de boucle, pieds de colonnes, ballon d'eau chaude, points sur la chaîne de production d'eau de dialyse..., qui doivent être équipés d'un robinet facilitant le prélèvement (il faut aussi tenir compte de la gestion des eaux de purge : présence d'un raccordement au réseau d'évacuation, utilisation d'un récipient...) ;
- Les points d'usage (tableau 12) : robinet, douche.... ;
- Avec comme objectifs :
 - contrôle de l'exposition (eau telle qu'elle est utilisée) : prélever sans démontage ni désinfection ni purge,
 - contrôle des conditions de maîtrise du réseau interne (eau qui parvient au point d'usage) : prélever après démontage du périphérique de distribution, désinfection et purge prolongée de façon à éliminer l'eau résiduelle.

Remarques :

- Pour les douches l'utilisation d'un flacon à col large ou d'un entonnoir stérile peut faciliter le prélèvement.
- L'eau de soins est un mélange d'eau froide et chaude (eau mitigée) : le prélèvement sera réalisé quand la température d'usage sera atteinte.

Tableau 12 : Modalités de prélèvements des points du réseau en fonction de l'objectif (d'après la norme NF EN ISO 19458 (2006))

Points de prélèvements	Objectifs	Retirer les accessoires et inserts	Désinfecter	Rincer *	Purger ⁴⁷
Points techniques	Contrôle de l'eau au départ du circuit	Oui	Oui	Non	Oui
Point d'usage - 1	Contrôle de l'eau dans le circuit interne	Oui	Oui	Oui	Non sauf si recherche de Légionelles
Point d'usage - 2	Contrôle de l' exposition	Non	Non	Non	Non

**rincer brièvement uniquement pour annuler les effets de la désinfection (environ 30 secondes)*

- Eau de piscine : le prélèvement est effectué en subsurface (entre -10 et -30 cm à l'opposé de l'arrivée d'eau et en sens inverse du flux) :
 - avec un flacon « neutre »⁴⁸ stérile à l'intérieur et stérile ou désinfecté à l'extérieur plongé à l'horizontale (canne de prélèvement désinfectée, FHA ou gants à usage unique à manchette longue) et redressé (« geste du semeur », figure 15) jusqu'à ce que le volume d'eau recueilli soit suffisant tout en gardant un volume d'air dans le flacon pour permettre une agitation correcte avant analyse ;
 - transvaser aseptiquement dans un flacon stérile avec neutralisant.



Figure 15 : Schéma du prélèvement d'eau en piscine

⁴⁷ De nombreux micro-organismes présents dans l'eau proviennent de la rupture du biofilm et de la remise en suspension de dépôts des joints ou des coudes en cas de pointes de débit et de coup de bélier. Pour minimiser ces effets, ouvrir le robinet au débit maximal pendant 5 s à 10 s, puis réduire le débit de moitié pendant le temps nécessaire de purge (2 à 3 minutes) et placer le flacon sous le robinet sans le fermer et le rouvrir.

⁴⁸ L'utilisation directe du flacon avec le neutralisant peut entraîner une dispersion de celui-ci dans l'eau de la piscine lors du prélèvement (possibilité de visualiser le phénomène en utilisant un flacon contenant un colorant non toxique).

- Eau des fontaines et brumisateurs : le prélèvement sur un écoulement en continu peut nécessiter l'emploi d'une canne à prélèvement pour positionner le flacon à prélèvement au niveau de l'écoulement d'eau ;
- Eau de dialyse : la réalisation des prélèvements des eaux de dialyse, en particulier sur les appareils d'hémodiafiltration, nécessitent des protocoles d'asepsie rigoureux et éventuellement du consommable dédié (poches de prélèvement stériles, apyrogènes, avec date de péremption contrôlée) afin que les échantillons ne soient pas contaminés avant analyse ;
- Eau en stérilisation (eau de station de traitement de l'eau permettant d'avoir l'eau adoucie et l'eau osmosée) : avant et après adoucisseur, avant et après osmoseur, sortie de cuve avant départ de boucle de distribution.

Identification du prélèvement

- Respecter le protocole d'étiquetage des échantillons et compléter la fiche de prélèvement.

Conditions de transport et délai d'acheminement

- Les prélèvements bactériologiques sont transportés dans un emballage propre, à l'abri de la lumière en s'assurant que le flaconnage est bien étanche ;
- Sauf indication contraire dans les normes spécifiques et si la durée du transport est supérieure à 8 heures, réfrigérer les échantillons ($5 \pm 3^\circ\text{C}$) pendant le transport (préférer les blocs réfrigérants qui limitent le risque de « mouillage » des étiquettes ou inscriptions sur les flacons, ...) :
 - ne pas congeler (la formation de glace peut entraîner la mort de la majorité des cellules ($\geq 99\%$) !) : il faut donc protéger les échantillons de tout contact direct avec les réfrigérants,
 - pour les eaux chaudes ; suivant la version 2014 de la norme afnor NF T90-431 les ensemencements doivent être réalisés le plus rapidement possible et au maximum le lendemain du prélèvement. Le transport et la conservation de l'échantillon sont réalisés à température ambiante de préférence en enceinte isotherme non réfrigérée,
 - il est recommandé de séparer les échantillons chauds des échantillons froids ;
- Si la durée de transport dépasse 8 heures, il est nécessaire de s'assurer que l'échantillon est maintenu à la bonne température par un contrôle de celle-ci dans l'enceinte⁴⁹ (tableau 13) ;
- Le délai entre le prélèvement et l'analyse (transport, enregistrement et traitement en laboratoire) doit être consigné dans le rapport s'il dépasse 8 h car il peut diminuer la fiabilité des résultats.

Tableau 13 : Exemples de valeurs recommandées (R) et acceptables (A) pour la durée maximale de conservation d'échantillon incluant le temps de transport et les températures, sauf spécification contraire dans des normes spécifiques (d'après la norme NF EN ISO 19458:2006)

Analyse	Durée maximale de conservation d'échantillon (h) y compris le transport		Température de conservation de l'eau ($^\circ\text{C}$)	
	R	A	R	A
Micro-organismes cultivables (à 22°C , 30°C ou 36°C)	8	12	5 ± 3	ambiante
Indicateurs fécaux, bactéries (forme végétative) <i>E. coli</i> (et bactéries coliformes) Entérocoques <i>Clostridium perfringens</i>	12	18	5 ± 3	
Spores de bactéries sulfito-réductrices (<i>Clostridium</i> spp.)	24	72	5 ± 3	
Autres micro-organismes <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8	12	ambiante	5 ± 3

(R : recommandé ; A : acceptable) d'après la norme ISO 19458:2006

⁴⁹ Entre 0°C et 45°C , les réactions bactériennes sont proportionnelles à la température. Si une microflore se multiplie, la vitesse de multiplication est d'autant plus grande que la température est élevée. À l'inverse, si la microflore est en train de mourir, la réaction est également accélérée lorsque la température est élevée. En bactériologie, il est généralement supposé un Q10 de 2 en présence d'éléments nutritifs. Ceci signifie qu'une élévation de température de 10°C double la vitesse à la fois du processus de multiplication et du processus de mortalité. Il est donc important de réfrigérer les échantillons pendant le transport mais pas de les congeler, étant donné que la formation de glace peut entraîner la mort de la majorité des cellules ($\geq 99\%$). Seuls les échantillons destinés à l'analyse de virus peuvent être conservés à -70°C si un cryoprotecteur approprié est ajouté à l'échantillon.

« Cas particuliers » des eaux de dialyse

Les eaux de dialyse demandent une attention particulière et répondent à une réglementation spécifique (tableaux 14 et 15).

Tableau 14 : Points de prélèvements et fréquence pour l'hémodialyse conventionnelle

Type d'analyse	Site de prélèvement	Volume analysé	Fréquence	Référentiels
FAR à 22° C	Départ de boucle d'alimentation des générateurs de dialyse (eau de dilution des concentrés d'hémodialyse)	1 mL (*) 100 mL (**)	Fonction du nombre des séances annuelles	Circulaire DGS/DH/AFSSAPS n° 2000-337 du 20 juin 2000
	Circuit du système de production d'eau pour dilution des concentrés d'hémodialyse : point définis en fonction des installations	100 mL par point	Annuelle Voire plus, en fonction de l'analyse de risque menée par l'utilisateur	
	Dialysat (en amont de l'hémodialyseur)	100 mL de dialysat affluent (en amont de l'hémodialyseur)	Annuelle Voire plus, en fonction de l'analyse de risque menée par l'utilisateur	Norme NF S93-315 (2008)

* Pharmacopée.

** En pratique, les centres de dialyse exigent une qualité supérieure à celle de la pharmacopée pour l'eau de dilution des concentrés d'hémodialyse (filtration de 100 mL).

Tableau 15 : Programme de contrôle microbiologique de qualification et de suivi des performances des eaux de dialyse pour la pratique de l'hémofiltration et de l'hémodiafiltration « en ligne » (hors endotoxines et analyses physicochimiques)

Type d'analyse	Site de prélèvement	Volume analysé	Fréquence <u>Qualification</u>	Fréquence <u>Suivi</u>
FAR à 22°C	Départ de boucle d'alimentation des générateurs de dialyse	1 litre	4 analyses consécutives au minimum avant le démarrage de la technique (soit 1 fois/semaine pendant un minimum de 1 mois)	Fonction du nombre des séances annuelles
	Dialysat ultra pur (en amont de l'hémodialyseur)	100 mL	Une analyse avant le démarrage de la technique puis 1 fois/mois pendant le 1 ^{er} trimestre	Minimum une fois/trimestre et après chaque intervention sur le circuit hydraulique du générateur en tenant compte des recommandations du fabricant
	Solution de substitution (après la seconde ultrafiltration du dialysat)	500 mL ou filtration in situ du volume injecté sur membrane à 0,45 µm	Une analyse avant le démarrage de la technique puis 1 fois/mois pendant le 1 ^{er} trimestre	Minimum une fois/trimestre et après chaque intervention sur le circuit hydraulique du générateur en tenant compte des recommandations du fabricant

(d'après la circulaire DHOS/AFSSAPS/DGS n° 2007-52 du 30 janvier 2007)

Tableau 1 : Liens hypertextes par thème

GENERALITES (communes aux 4 thèmes)	Chapitre 1 Stratégie (p 17)	Chapitre 3 Prélèvement (p 41)	Chapitre 4 Analyse (p 720)	Chapitre 5 Interprétation (p 84)
AIR	Stratégie (p 21)	Prélèvement CP (p 45) Aerobio (p 50)	Analyse (p 73)	Interprétation (p 86)
EAU	Stratégie (p 25)	Prélèvement (p 54)	Analyse (p 75)	Interprétation (p 90)
SURFACES	Stratégie (p 28)	Prélèvement (p 60)	Analyse (p 78)	Interprétation (p 92)
ENDOSCOPES	Stratégie (p 31)	Prélèvement (p 64)	Analyse (p 81)	Interprétation (p 95)

Prélèvements des surfaces

Principe

Recherche de bactéries, de levures et de champignons filamenteux présents sur une surface soit :

- directement sur un milieu de culture (empreinte gélosée),
- sur un support (écouvillon...) mis secondairement en culture.

Fréquence

Il n'y a pas de standard en matière de périodicité de prélèvement.

On peut trouver des indications comme :

- **Pour la thérapie cellulaire** ⁽¹²⁾ : « les contrôles microbiologiques de l'air et des surfaces (notamment des paillasse et des postes de travail de classe A) sont réalisés, conformément aux recommandations méthodologiques issues des normes ISO relatives aux salles propres et environnements maîtrisés apparentés, selon une périodicité, un plan de surveillance et des méthodes d'échantillonnage décrites dans une procédure. Ces contrôles concernent les contaminations liées à la flore bactérienne et fongique ... la périodicité des contrôles microbiologiques des surfaces en activité est a minima mensuelle pour les 4 classes » ;
- **Pour la pharmacie** ⁽¹³⁾ : « Les opérations aseptiques doivent être fréquemment surveillées par des méthodes telles que l'utilisation des boîtes de Pétri, des échantillons volumétriques d'air et des prélèvements de surfaces (écouvillons et géloses de contact, par exemple). Les méthodes d'échantillonnage utilisées en activité ne doivent pas interférer avec la protection des zones. Les surfaces sont contrôlées selon une périodicité définie. Une surveillance microbiologique supplémentaire est également nécessaire en-dehors des phases de préparation, par exemple après les opérations de validation, de maintenance, de nettoyage ou de désinfection » ;
- **Pour la stérilisation** ⁽¹⁾ : « La fréquence des contrôles dépend du type d'établissement et de l'environnement. » La périodicité définie avec le CLIN et/ou l'EOH dans le cadre d'un plan d'échantillonnage intégré dans une démarche qualité et ponctuel en cas de travaux. « en situation maîtrisée, un contrôle semestriel peut suffire mais lorsque la situation est instable ou non maîtrisée, un contrôle bi ou trimestriel selon la situation peut être proposé ».

Pour les autres secteurs sans indications spécifiques, la fréquence des prélèvements de surfaces sera intégrée dans une démarche qualité et établie en fonction du local et des patients qui y sont hébergés en veillant à éviter l'inflation des analyses. Le tableau 16 propose des fréquences de prélèvements en fonction du niveau de risque de la zone à surveiller.

Tableau 16 : Proposition de fréquence de prélèvements de surface « au repos » en fonction du niveau de risque

Niveau de risque infectieux	Risque 4	Risque 3	Risque 2	Risque 1
Exemples d'après la norme NF S90-351(2013)	Salle d'opération : orthopédie avec implant articulaire Unités protégées (hématologie)	Salle d'opération chirurgie digestive, urologie... Salle d'imagerie interventionnelle	Salle de soins post interventionnels Chambre réanimation polyvalente	Salle d'endoscopie Chambre d'hospitalisation standard
Fréquence des prélèvements de surface « en routine »*	Trimestrielle à mensuelle	Trimestrielle	Semestrielle à trimestrielle	A définir en fonction des objectifs de l'ES

*en l'absence de fréquences définies par les normes ou les recommandations, les fréquences ci-dessus sont données à titre indicatif par le groupe de travail. Il convient de les adapter en fonction de l'analyse de risque effectuée au sein de chaque établissement.

Moment du prélèvement

Le prélèvement est effectué de préférence dans la zone au repos, hors activité et après bionettoyage sauf recommandations spécifiques où les prélèvements peuvent être effectués en activité (pharmacie, thérapie cellulaire, stérilisation) :

- Quand le prélèvement est réalisé par la méthode par empreinte gélosée, la gélose et les surfaces à prélever doivent impérativement être parfaitement sèches ;

- Pour les zones à environnement maîtrisé (ZEM), si les prélèvements sont réalisés en même temps que les prélèvements d'air, les mêmes règles s'appliquent : bionettoyage effectué, surfaces parfaitement sèches, délai après bionettoyage équivalent de 3 CP_{0.5} (ou d'au moins 1 heure s'il n'est pas connu avec précision) ;
- Dans les autres situations (hors ZEM), les prélèvements sont à faire à la fin du bionettoyage après séchage et temps d'action du produit ($\approx 1/4$ heure).

Matériel commun aux différentes techniques

- Plan d'échantillonnage préétabli et validé (EOH, CLIN) ;
- Fiche de prélèvement (date, l'heure, lieu du prélèvement, identité du préleveur, circonstances de prélèvement (planifié ou non, secteur en activité ou non, heure du nettoyage...)) ;
- Milieu de culture adapté pour limiter l'effet inhibiteur des principes actifs des produits détergents désinfectants utilisés pour l'entretien des surfaces ;
- Supports de prélèvements (boîtes, écouvillons....) ;
- Ruban adhésif ou système de transport des supports de prélèvements.

Réalisation du prélèvement

- Respecter les règles d'hygiène de la zone où les prélèvements seront effectués (tenue, hygiène des mains, désinfection du matériel...).
- Dans des cas particuliers de prélèvements en zone « hyper protégée comme les isolateurs ou les PSM en thérapie cellulaire), des milieux conditionnés en double emballage stérile peuvent être utilisés.
(Pour les isolateurs : les boîtes de géloses «contact » sont à déposer dans un sas matériel attendant à l'isolateur et désinfectées extérieurement afin de ne pas rompre l'asepsie régnant à l'intérieur de ce dernier).

Technique par empreinte gélosée

- Matériel :
 - le plan d'échantillonnage ;
 - la fiche de prélèvement qui comprend ;
 - boîtes de gélose « contact » (figure 16) : sauf indication particulière les milieux utilisés sont non sélectifs (NF EN 14698 (2004)): ex : gélose TSA (trypticase soja agar), PCA (plate count agar)... (annexe 4). Il convient d'utiliser des milieux de culture contenant un ou plusieurs neutralisants actifs sur les produits détergent-désinfectants dont des résidus peuvent subsister sur les surfaces prélevées et contrarier la croissance des micro-organismes détachés de la surface ;

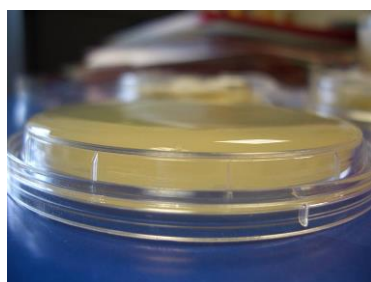


Figure 16 : Photo du « profil convexe » d'une boîte contact non ensemencée

- applicateur (pression et temps de contact standardisés) ou poids de 500 g (± 50 g) et chronomètre permettant de standardiser le prélèvement ;
 - lingettes détergentes-désinfectantes ou articles d'essuyage à usage unique (compresses...) et produit détergent-désinfectant.
- Description :
 - vérifier la date de péremption ;
 - sur le lieu des prélèvements ouvrir l'emballage du paquet de boîtes ;
 - réaliser une désinfection des mains par friction (FHA) ;
 - saisir une boîte par le fond (du côté de la gélose) ;

- utiliser un applicateur (figure 17 a) permettant de standardiser le prélèvement (force d'appui de 25g/cm² pendant 10 secondes) (Norme NF EN ISO 14698-1 (2004)) : dans ce cas installer la boîte contact avant d'enlever le couvercle ;
- ou enlever le couvercle et le tenir à la main ou posé face externe sur une surface propre pendant le prélèvement et appliquer la face gélosée sur la surface à prélever et déposer une masse de 500 g ($\pm$ 50g) (figure 17 b) pendant 10 secondes sans décrire de mouvement circulaire ou linéaire (Norme ISO NF EN 14698-1 (2004)) ni latéral (Norme NF ISO 18593 (2004)) ;
- méthode alternative non normées :
 - * Meunier et col. ⁽⁸⁾ proposent d'utiliser une masse de 200 g laissée en contact pendant 2 minutes avec des rendements d'extraction équivalents au poids de 500 g ;
 - * méthode « simplifiée » : appliquer une pression avec les doigts sur le fond de la boîte sans mouvement circulaire ni linéaire (résultats semi-quantitatifs).



a



b

Figure 17 : Méthodes de prélèvements de surface par boîte contact.

(a : applicateur, b : poids de 500 g)

- fermer la boîte ;
- l'identifier : écrire en petit sur le bord et jamais sur le couvercle ;
- essuyer la surface prélevée avec une compresse ou une lingette imbibée de détergent-désinfectant (pour éliminer les traces de géloses potentiellement déposées sur la surface prélevée).

Transport et délai d'acheminement

Les conditions de transport des échantillons doivent assurer la survie des micro-organismes collectés :

- maximum 24 heures à température ambiante⁵⁰,
- ne pas réfrigérer.

De plus, les échantillons doivent être placés dans un conditionnement évitant tout risque de contamination externe (les boîtes prélevées dans une même zone seront regroupées dans un « contenant retour » identifié : date, l'heure, lieu des prélèvements).

Technique par écouvillonnage

- Matériel utilisé :
 - écouvillons stériles emballés dans un fourreau, « traditionnels » en fibres (coton ou autres : Dacron, Rayon, polyester...), en mousse ou mieux écouvillons en nylon floqués (figure 18) ;
 - diluant-neutralisant :
 - * est utilisé pour humidifier si besoin l'écouvillon et éviter l'inhibition de la croissance des germes par les résidus de détergent-désinfectant potentiellement présents sur les surfaces,
 - * peut servir de milieu de transport ;
- Seuls les écouvillons spécifiquement prévus pour les prélèvements des surfaces environnementales proposent un milieu de transport avec neutralisant ;
- gabarit (stérilisable et/ou désinfectable), si besoin, pour garantir un prélèvement d'une superficie identique d'un contrôle à un autre ou d'un point de prélèvement à un autre. La Norme ISO 18593 (2004) suggère une surface minimale à couvrir entre 20 et 100 cm², calibrée si possible avec un gabarit pour standardiser la technique et obtenir une technique semi-quantitative.

⁵⁰ Les boîtes prélevées ainsi que la feuille de prélèvement seront acheminées le plus rapidement possible. La Norme NF ISO 18593 propose un transport en moins de 4 heures, cependant les guides autorisent un délai d'acheminement : 24 heures maximum à température ambiante (1).



Ecouvillons standards



Ecouvillon floqué

Figure 18 : Exemples d'écouvillons pour prélèvements de surface

- Technique :

- si nécessaire, humidifier l'écouvillon à l'aide du diluant-neutralisant ou d'un milieu de rinçage stérile (Norme NF EN ISO 14698-1 (2004)) (eau distillée stérile, sérum physiologique, bouillon nutritif plus neutralisant, thioglycolate pour la recherche de *Clostridium*) : cette étape améliore le relargage des bactéries du support ^{(19) (20)} ;

Remarque : A noter que les écouvillons floqués ne nécessitent pas d'humidification préalable.

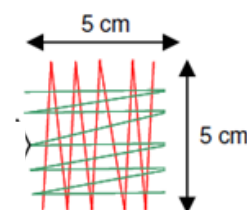
- passer l'écouvillon en stries parallèles rapprochées sur la surface à prélever (éventuellement délimitée par le gabarit préalablement stérilisé ou désinfecté, en faisant tourner légèrement l'écouvillon : habituellement, il est préconisé un angle de 45°, une pression constante et un balayage de la surface suivant une technique bien définie (Norme NF EN ISO 14698-1 (2004)) ;
- répéter l'échantillonnage de la même zone par des stries perpendiculaires aux premières (figure 19) ;



a



b



c

Figure 19 : Représentation schématique d'un prélèvement de surface par écouvillonnage.

(a : direct, b : avec gabarit, c : technique de prélèvement)

- mettre de façon aseptique l'écouvillon dans le tube de transport ;
- identifier le prélèvement ;
- essuyer la surface prélevée avec une compresse ou une lingette imprégnée de détergent-désinfectant ;
- compléter la fiche de prélèvement.

Remarque : Il existe d'autres supports de prélèvements ^{51 52} (éponges, chiffonnettes, plaques de sédimentation...) qui permettent d'échantillonner de grandes surfaces plutôt utilisés dans l'industrie ou pour des recherches ciblées.

- Conditions de transport et délai d'acheminement

Quand le temps entre le prélèvement et l'analyse n'est pas spécifié par le fabricant, il convient de transmettre l'écouvillon au laboratoire dans son étui protecteur le plus rapidement possible dans des conditions qui n'altèrent pas la viabilité ni le nombre de micro-organismes, à l'abri d'une contamination (Norme NF EN ISO 14698-1(2004)) et de préférence en moins de 4h. En revanche, contrairement aux boîtes contact qui ne doivent pas être réfrigérées, l'écouvillon sera maintenu à $5 \pm 3^\circ\text{C}$ si le délai d'acheminement est supérieur à 4h. Le temps de transport ne dépassera jamais 24h.

Tableau 1 : Liens hypertextes par thème

GENERALITES (communes aux 4 thèmes)	Chapitre 1 Stratégie (p 17)	Chapitre 3 Prélèvement (p 41)	Chapitre 4 Analyse (p 720)	Chapitre 5 Interprétation (p 84)
AIR	Stratégie (p 21)	Prélèvement CP (p 45) Aerobio (p 50)	Analyse (p 73)	Interprétation (p 86)
EAU	Stratégie (p 25)	Prélèvement (p 54)	Analyse (p 75)	Interprétation (p 90)
SURFACES	Stratégie (p 28)	Prélèvement (p 60)	Analyse (p 78)	Interprétation (p 92)
ENDOSCOPES	Stratégie (p 31)	Prélèvement (p 64)	Analyse (p 81)	Interprétation (p 95)

⁵¹ L'utilisation d'écouvillons, d'éponges ou de tissus d'essuyage stériles humides est particulièrement commode pour l'échantillonnage de surfaces importantes, non absorbantes, irrégulières ou encastrées, et n'étant par conséquent pas accessibles aux dispositifs par contact (ISO 14698-1 (2004)).

⁵² Les plaques de sédimentation sont adaptées à l'évaluation qualitative et quantitative d'une contamination potentielle d'une surface par le dépôt de particules viables aéroportées. Cette technique ne mesure pas le nombre total de micro-organismes qui sont présents dans l'air; elle mesure le nombre qui s'est déposé sur une surface pendant un laps de temps donné. La sensibilité de cette méthode peut être améliorée en utilisant des boîtes de Pétri de grand diamètre (c'est-à-dire de 14 cm de diamètre) et en prolongeant la durée d'exposition, tout en prenant soin d'éviter la déshydratation du milieu de culture (ISO 14698-1 (2004)).

Prélèvements en endoscopie

La surveillance microbiologique concerne les endoscopes, l'eau utilisée pour leur traitement et les enceintes de stockage. Il est nécessaire de respecter les règles d'hygiène et de sécurité afférentes au lieu du prélèvement et au prélèvement lui-même (procédure d'accès, habillage, hygiène des mains, désinfection du matériel...).

Attention : Une instruction est en cours de rédaction et sera publiée en 2016. C'est un document unique qui concerne le traitement des endoscopes souples thermosensibles. Dès sa parution, ce texte sera la référence réglementaire à appliquer.

Endoscopes

Principe

Détecter des micro-organismes (flore aérobie revivifiable) indicateurs de dysfonctionnements éventuels, en dehors d'un contexte d'investigation, par prélèvement aseptique des canaux de l'endoscope.

Rappel : Le contrôle est un instantané de l'état de l'endoscope au moment du prélèvement.

Fréquence

En dehors de situations ponctuelles (alerte nationale ou locale, dysfonctionnement, qualifications LDE, ESET....), le rythme des prélèvements recommandé est le suivant :

- pour les contrôles programmés : au minimum une fois par an par endoscope en échelonnant les prélèvements sur toute l'année ;
- pour les contrôles ponctuels, dans les cas suivants :
 - retour de maintenance,
 - alerte de matériovigilance,
 - matériel neuf,
 - matériel de prêt (appel d'offre ...),
 - investigation d'un ou plusieurs cas d'infection(s) associée(s) aux soins pouvant faire suspecter la responsabilité d'un endoscope,
 - lors de changements de processus de traitement.

Rappel : Pour les contrôles programmés, prévoir la planification en début d'année.

Moment du prélèvement

Il doit être compatible avec l'activité du service (matériel et personnel du service disponibles).

De façon générale, les endoscopes doivent être prélevés après avoir subi un cycle complet d'entretien et :

- pour les endoscopes utilisés en cavité stérile (et non stérilisables) :
 - soit en conditions d'utilisation : c'est-à-dire tout de suite après la désinfection,
 - soit en conditions « défavorables » pour « optimiser » la sensibilité le prélèvement : c'est à dire après un temps de latence qui est au moins de 6 heures et à condition que l'endoscope soit préservé des contaminations externes par un emballage (champ) stérile et que ces paramètres soient clairement précisés sur la fiche de prélèvement et sur le rapport d'essai (CR) ;
- pour les autres endoscopes : éviter de faire des prélèvements trop précoces (après désinfection de début de programme, après désinfection entre deux patients) qui risquent de s'avérer faussement négatifs ; une durée de stockage d'au moins 6 heures ⁽³⁾ est conseillée pour optimiser la sensibilité du prélèvement car elle peut permettre le développement de micro-organismes pour qu'ils soient plus facilement détectables.

Préleveurs

La présence de 2 personnes formées aux prélèvements des endoscopes est souhaitable :

- une personne formée, ou mieux habilitée, aux prélèvements microbiologiques environnementaux (technique aseptique) ;
- une personne ayant une bonne connaissance de l'architecture interne et aussi du fonctionnement des endoscopes⁵³ comme par exemple un personnel du service concerné, habituellement chargé du traitement des endoscopes.

Les préleveurs manipulent conformément aux règles d'asepsie adaptées à la réalisation du prélèvement (champs stérile, hygiène des mains, gants stériles, masque chirurgical, surblouse ou tablier, nettoyage-désinfection des plans de travail, flacons et solutions de prélèvement stériles ...).

Matériel nécessaire

- Fiche de prélèvement,
- Matériel (tableau 17).

Tableau 17 : Matériel nécessaire pour un prélèvement d'endoscope sur site

Matériel stérile	Matériel propre	Autre
- Flacon(s) de recueil, - Seringue(s) à vis ou à bout conique de 60 mL, - + seringue(s) de 10mL pour irriguer les canaux auxiliaires type « water jet » (si prélèvement canal par canal), - Solution de prélèvement*, - Gants stériles (préleveur), - Compresses, - Champ(s), - Et, si besoin : ▪ aiguille(s) ▪ irrigateur tout conduit ** ▪ tubulure(s).	- Masque chirurgical - Surblouse ou tablier - Gants non stériles (aide)	- Collecteur OPCT (si besoin) - Solution hydro alcoolique (SHA) - Alcool à 70° - Feutre indélébile - Feuille de prélèvement dûment remplie

* La solution de prélèvement⁽³⁾ (exemple : « Diluant Neutralisant Pharmacopée = DNP » doit présenter les caractéristiques suivantes :

- être stérile,
- posséder un bon pouvoir de récupération des micro-organismes (activité tensio-active),
- neutraliser l'activité résiduelle des désinfectants (sinon risque de faux négatif),
- ne pas influencer sur la viabilité et la croissance des micro-organismes.

** Irrigateur tout conduit (pieuvre) : soit stérile soit ayant subi au minimum une désinfection de même niveau que l'endoscope et correctement séché à l'air médical.

Réalisation du prélèvement

Le prélèvement est :

- global en première intention (tous les canaux ensemble (figure 17),
- canal par canal dans le cas d'un résultat non satisfaisant lors du prélèvement global.

Dans le cadre de l'investigation d'une épidémie, d'autres points de prélèvement peuvent être envisagés : bouchons, pistons, valves, connectiques...

Règles communes :

- Les extrémités d'injection (proximale) et de recueil (distale) de la solution de prélèvement sont désinfectées à l'alcool à 70°,
- Les connectiques, raccords et matériels utilisés doivent être au mieux stérilisés ou, à défaut, désinfectés suivant le même mode opératoire que l'appareil et rincés à l'eau stérile,

⁵³ Bonne connaissance de la conception interne des endoscopes : nombre et type de canaux notamment, (disposer au minimum d'un schéma en coupe de l'endoscope ou d'un représentant de la famille)

- Purger les canaux à l'air pour récupérer le maximum de solution de prélèvement,
- La solution de prélèvement injectée est récupérée dans un (des) récipient(s) stérile(s).

Remarque : Quelle que soit la technique d'injection, mais plus particulièrement lors de l'utilisation d'un irrigateur tous conduits, il faut contrôler visuellement l'écoulement de la solution de prélèvement dans chaque canal en visualisant la sortie par les différents orifices de l'extrémité de la gaine.

- Immédiatement après le prélèvement, il est recommandé :
 - de rincer et d'irriguer l'endoscope à l'eau du réseau pour éliminer les résidus de solution de prélèvement,
 - puis d'appliquer une procédure complète de traitement telle que réalisée habituellement pour cet endoscope.

Le prélèvement « global » concerne tous les canaux (opérateur, aspiration, air-eau, érecteur et canaux accessoires comme le canal water-jet présent par exemple pour certaines références de coloscopes ou écho-endoscopes) (figure 17), le volume minimal recommandé pour l'analyse est :

- volume injecté : 100 à 200 mL, mais peut varier suivant l'endoscope contrôlé (ex : 10 à 20 mL pour les sialendoscopes),
- volume récupéré qui sera mesuré au laboratoire lors de l'analyse (supérieur ou égal à 80 % du volume injecté).



Endoscope



Gants stériles



Gros plan



Matériel stérile (exemples)



Désinfection de l'embout

Injection de la solution de
prélèvement

Vue globale



Recueil dans flacon stérile

Figure 20 : Illustration d'un prélèvement global d'endoscope

Le prélèvement canal par canal est réalisé pour une analyse individualisée⁵⁴, en 2^{nde} intention le plus souvent dans le cadre d'une investigation.

À titre indicatif, les volumes à recueillir sont de :

- 10 mL pour le canal érecteur,
- 20 mL pour le canal « water jet »,
- 40 mL pour le canal air/eau,
- 40 mL pour le canal opérateur,
- 40 mL pour le canal aspiration/opérateur.

Cas particulier des prélèvements d'endoscopes dans un LDE ou dans une ESET

Certains fabricants proposent la possibilité d'effectuer les prélèvements par l'intermédiaire des laveurs désinfecteurs d'endoscopes ou des ESET.

Pour les LDE, cette méthode de prélèvement n'est pas recommandée immédiatement après le cycle en routine car elle ne permet pas de durée de stockage avant le prélèvement. Cependant le prélèvement peut être effectué à l'aide de bloqueurs spécifiques proposés par le fabricant du LDE et après stockage.

Pour les ESET, le prélèvement peut être effectué directement dans le tiroir de stockage à l'aide de bloqueurs spécifiques adaptés à l'ESET.

⁵⁴ Pour canaux de petits volumes utiliser des seringues d'un volume adapté.

Identification des échantillons prélevés

Respecter le protocole d'étiquetage des flacons et compléter la fiche de prélèvement.

Conditions de transport et délai d'acheminement

L'analyse de l'échantillon prélevé doit se faire dans un délai le plus court possible après le prélèvement. Si l'analyse **dans les 2 heures** n'est pas possible, l'échantillon doit être maintenu à $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ dans l'attente de l'analyse pour une durée maximale de 24h.

Eau en endoscopie

Principe

Les contrôles de l'eau utilisée en endoscopie permettent de vérifier que la qualité de l'eau est conforme aux recommandations. Ils concernent :

- l'eau d'alimentation des machines ou des postes de lavage des endoscopes (eau du réseau),
- l'eau immédiatement après le système de pré-traitement s'il existe (filtre UV, ...),
- l'eau de rinçage terminal utilisée soit en procédure de traitement manuel des endoscopes soit dans un laveur désinfecteur d'endoscopes (LDE).

Remarque : Pour l'eau de rinçage terminal en LDE, il existe un cycle spécifique qui permet de prélever l'eau dans les conditions d'asepsie rigoureuse.

Fréquence

La fréquence des prélèvements de l'eau est identique pour le traitement manuel ou automatisé (LDE) des endoscopes (tableau 18).

De plus, une qualification (et requalification) de performances doit être réalisée pour les LDE.

Tableau 18 : Fréquence des contrôles bactériologiques sur les eaux utilisées en endoscopie ⁽⁴⁾

Eau	Alimentation, avant tout traitement	Immédiatement après le système de pré-traitement de l'eau (filtre, UV...) s'il existe	Rinçage terminal
Fréquence prélèvements	Trimestrielle	Trimestrielle	Mensuelle sauf si filtres à UU

Les contrôles des eaux de rinçage terminal sont réalisés avec une fréquence minimale mensuelle pour les systèmes de traitement chimiques et physiques à l'exception des systèmes de microfiltration à usage unique qui ne justifient pas de réaliser des contrôles bactériologiques, une fois que le procédé a été validé et que ses modalités d'utilisation sont régulièrement contrôlées⁵⁵.

Enceintes de stockage des endoscopes thermosensibles (ESET)

Les enceintes de stockage des endoscopes thermosensibles sont soumises à des qualifications de performance (annexe 5) et à des contrôles de routine qui concernent l'enceinte en elle-même et les endoscopes qui y sont stockés.

⁵⁵ Les systèmes de microfiltration à usage unique ne justifient pas de réaliser des contrôles bactériologiques, une fois que le procédé a été validé et que ses modalités d'utilisation sont régulièrement contrôlées sauf s'il y a des tubulures ou raccords à l'extrémité terminale sans protocole d'utilisation validé.

Les endoscopes stockés dans les ESET

L'augmentation de la durée de stockage à 72 heures avant une nouvelle désinfection justifie la mise en œuvre de prélèvements microbiologiques :

- Il faut prélever l'ensemble des endoscopes dans le mois qui précède la mise en ESET ;
- Puis un exemplaire de chaque famille⁵⁶ d'endoscope stocké dans l'ESET doit être prélevé trimestriellement et chaque endoscope au moins une fois par an. En cas de non-conformité d'un prélèvement, une investigation doit être menée pour déterminer si le problème est inhérent à l'endoscope, à son processus de traitement ou à l'ESET. Le moment optimal des prélèvements est la fin de la période de stockage maximale définie pour l'ESET (ou le délai moyen de sortie des endoscopes de l'ESET).

Remarque : Il est souhaitable de contrôler les endoscopes de façon progressive afin de perturber le moins possible la disponibilité du matériel. Pour les prélèvements avant utilisation de l'ESET (T0), les endoscopes peuvent être utilisés sans attendre le résultat de l'analyse. Pour les prélèvements après stockage en ESET, il suffit, après le prélèvement, d'appliquer une procédure complète de traitement telle que réalisée habituellement pour cet endoscope pour pouvoir le réutiliser immédiatement dans le délai habituel de stockage hors ESET de 12 heures.

Prélèvements d'air et surface dans les ESET

Les prélèvements d'air⁵⁷ et de surface à l'intérieur de l'ESET sont effectués pour vérifier l'état microbiologique de l'ESET. Des indications sur la nature et la périodicité de ces contrôles sont fournies par l'avis du HCSP⁽⁵⁾ et la norme européenne NF EN 16442 (2015).

Remarque : Si le fabricant l'exige et donne des critères d'interprétation ou si la nature du local le justifie (ZEM), des prélèvements de surface et d'air doivent être réalisés dans le local où est installé l'ESET pour s'assurer de la maîtrise de l'environnement.

⁵⁶ Famille d'endoscopes : ensemble d'endoscopes dont les caractéristiques susceptibles d'avoir une influence sur l'efficacité de l'ESET sont identiques. Bien qu'il revienne au fabricant de l'ESET de définir ces familles, les caractéristiques suivantes peuvent, *a minima*, être utilisées pour définir ces familles : nombre de canaux, diamètre des canaux, architecture interne de l'endoscope (certains canaux peuvent être interconnectés), nature des connectiques utilisées pour raccorder l'endoscope à l'ESET (ces derniers peuvent provoquer des restrictions de flux ou être conçus pour permettre l'irrigation de plusieurs canaux).

⁵⁷ Les dispositifs passifs de prélèvement microbien, tels que les plaques de sédimentation, ne mesurent pas le nombre total de particules viables en suspension dans l'air; ils mesurent la vitesse à laquelle les particules viables se déposent sur les surfaces. Les plaques de sédimentation peuvent par conséquent servir pour l'évaluation qualitative et quantitative de la contamination des produits par voie aérienne. Cela peut s'effectuer en déterminant le nombre de particules sédimentées sur la plaque par unité de temps. Ensuite, en extrapolant la surface et le temps d'exposition du produit à partir de ceux de la plaque, il est possible de calculer la contamination potentielle du produit (ISO 14698-1 (2004)).

Tableau 19 : Tableau récapitulatif pour les prélèvements en endoscopie

Paramètres		Circonstances de prélèvement	Fréquences issues des recommandations	Référentiels	
Endoscopes		Etat des lieux	Ponctuelle	CTINILS, 2007 ⁽³⁾	
		Plan de surveillance programmé	Annuelle		
		Retours maintenance, matériel de prêt/appel d’offre, neuf..., alerte matériovigilance, investigation ou alerte locale	Ponctuelle		
		Qualification LDE	Ponctuelle	CTINILS, 2003 ⁽⁴⁾ , HCSP 2013 ⁽⁵⁾ Norme NF EN 16442 (2015)	
		Qualification ESET	Ponctuelle		
		Démarche qualité ESET : plan de surveillance programmé	Annuelle, par tranches trimestrielles		
Eaux (Voir aussi chapitre correspondants eaux)	Traitement manuel ou semi-automatique				
	Eau du réseau - soins standard	Plan de surveillance programmée	Trimestrielle	Ministère de la santé, 2005 ⁽¹⁴⁾ CTINILS, 2002 ⁽¹⁾	
	- bactériologiquement maitrisée (rinçage terminal)		Pas de prélèvement si filtres UU ⁵⁸		
	Traitement en LDE				
	Alimentation LDE (soins standard)	Plan de surveillance programmée	Trimestrielle	CTINILS, 2003 ⁽⁴⁾	
	Après système de pré-traitement (si existe)		Trimestrielle		
	Rinçage terminal (EBM)		Mensuelle		
	ESET	Prélèvements de surfaces	Vérifier l’état microbiologique de l’ESET - à l’installation	Ponctuelle	HCSP, 2013 ⁽⁵⁾ Norme NF EN 16442 (2015)
- dans le cadre d’un plan de surveillance programmée			Trimestrielle		
Contrôle particulière de l’air		Si le fabricant revendique un niveau de propreté particulaire pour vérifier le maintien de ce niveau	A l’installation, lors des changements de filtre,		
Contrôle microbiologique de l’air		Vérifier l’état microbiologique de l’ESET - à l’installation	Ponctuelle		
		- dans le cadre d’un programme de surveillance programmée (optionnel)	Définie dans le programme		

Tableau 1 : Liens hypertextes par thème

GENERALITES (communes aux 4 thèmes)	Chapitre 1 Stratégie (p 17)	Chapitre 3 Prélèvement (p 41)	Chapitre 4 Analyse (p 720)	Chapitre 5 Interprétation (p 84)
AIR	Stratégie (p 21)	Prélèvement CP (p 45) Aerobio (p 50)	Analyse (p 73)	Interprétation (p 86)
EAU	Stratégie (p 25)	Prélèvement (p 54)	Analyse (p 75)	Interprétation (p 90)
SURFACES	Stratégie (p 28)	Prélèvement (p 60)	Analyse (p 78)	Interprétation (p 92)
ENDOSCOPES	Stratégie (p 31)	Prélèvement (p 64)	Analyse (p 81)	Interprétation (p 95)

⁵⁸ Les systèmes de microfiltration à usage unique ne justifient pas de réaliser des contrôles bactériologiques, une fois que le procédé a été validé et que ses modalités d'utilisation sont régulièrement contrôlées sauf s'il y a des tubulures ou raccords à l'extrémité terminale sans protocole d'utilisation validé.

Chapitre 4

L'Analyse Méthodes et Résultats

Points importants

- L'utilisation d'une méthode analytique est indissociable de la définition préalable des critères d'interprétation de ses résultats ;
- **Quand la réglementation donne des valeurs de référence, il est indispensable de suivre strictement la technique indiquée car la notion de conformité est très dépendante de celle-ci :**
 - la croissance des germes est fonction des conditions de culture : composition du milieu, température d'incubation, atmosphère d'incubation et durée d'incubation,
 - au sein d'un échantillon, le dénombrement est influencé par la population des germes viables « stressés » qui seront cultivables ou non en fonction du milieu et des conditions de culture (température, durée, atmosphère). L'échantillon regroupe un ensemble de micro-organismes viables cultivables + micro-organismes viables non cultivables + micro-organismes morts) ;
- Les méthodes d'analyse employées et les résultats rendus doivent faire référence aux normes quand elles existent et quand elles sont utilisées ;
- Les résultats ne mettent en évidence que les micro-organismes concernés par les méthodes utilisées (ex : une empreinte gélosée ne mettra pas en évidence de germe anaérobie, sauf à incuber dans des conditions spécifiques...) ;
- Les résultats sont représentatifs de la qualité microbiologique de l'environnement à un instant T et ne sont pas extrapolables à un autre moment et encore moins à une autre localisation ; aucune méthode ne permet de définir une mesure absolue ;
- Les résultats des analyses sont des mesures relatives interprétées autant sur l'évolution dans le temps que sur leurs valeurs ponctuelles à chaque analyse ;
- Les résultats sont rendus « conformes » ou « non conformes » soit par rapport aux valeurs cibles des réglementations ou à des recommandations quand elles existent, soit en leur absence, par rapport aux valeurs cibles définies dans le contrat (cf CCTP) ;
- Les résultats ne sont interprétables que si le laboratoire utilise toujours la même méthode ;
- L'archivage des résultats est décrit en annexe 6.

Choix des températures et des durées d'incubation

Les temps d'incubation des prélèvements d'environnement sont plus longs que ceux généralement utilisés lors du traitement des prélèvements de biologie médicale.

Pour les prélèvements d'environnement, les températures et durées d'incubation sont soit :

- fixées par la réglementation (eau) ou les normes (air) ;
- disparates en fonction des recommandations mais aussi en fonction des laboratoires. : ainsi, **pour les surfaces**, une enquête ⁽¹³⁾ prenant en compte 32 centres hospitaliers a montré que :
 - la majorité des répondants, (21/32) utilisaient une seule température d'incubation et les autres incubaient de façon séquentielle (par exemple une première incubation à 37°C suivie d'une autre à 25°C) ;
 - la durée moyenne d'incubation s'élevait à 5,5 jours avec un écart-type de 2,4 jours ;
 - pour 5 CHU, les géloses étaient incubées à 30°C ou 37°C suivant les services échantillonnés (services cliniques à 37°C et services médico-techniques à 30°C) ou suivant la recherche microbienne fongique ou bactérienne.

Devant cette disparité, en particulier pour les contrôles des surfaces, le groupe s'est accordé pour (hors contexte réglementaire ou normatif qui différerait) restreindre le choix des températures et des durées d'incubation à :

- $30 \pm 2^\circ\text{C}$ pour la flore aérobie revivable (milieux tous germes : bactéries et champignons) pendant 5 à 7 jours ;
- $22 \pm 2^\circ\text{C}$ pour les recherches ciblées de champignons (milieux spécifiques) pendant 5 à 7 jours ;

- Avec dans les deux cas :
 - une 1^{ère} lecture à 48-72 heures,
 - une 2^{ème} lecture à 5 à 7 jours.

Le groupe déconseille l'incubation « séquentielle » (36°C puis 22°C de la même culture), souvent pratiquée, n'apparaissant dans aucune recommandation et difficilement accréditable.

Tableau 1 : Liens hypertextes par thème				
GENERALITES (communes aux 4 thèmes)	Chapitre 1 Stratégie (p 17)	Chapitre 3 Prélèvement (p 41)	Chapitre 4 Analyse (p 720)	Chapitre 5 Interprétation (p 84)
AIR	Stratégie (p 21)	Prélèvement CP (p 45) Aerobio (p 50)	Analyse (p 73)	Interprétation (p 86)
EAU	Stratégie (p 25)	Prélèvement (p 54)	Analyse (p 75)	Interprétation (p 90)
SURFACES	Stratégie (p 28)	Prélèvement (p 60)	Analyse (p 78)	Interprétation (p 92)
ENDOSCOPES	Stratégie (p 31)	Prélèvement (p 64)	Analyse (p 81)	Interprétation (p 95)

AIR : analyse - méthodes et résultats

Comptage particulaire

Le comptage particulaire ne nécessite pas d'analyses complémentaires au laboratoire.

Si un échantillonnage a été réalisé en chaque point de prélèvement, le résultat de la mesure sera pris en compte. Si plusieurs échantillonnages ont été réalisés pour un ou plusieurs points de prélèvements (ex : 2 ou 3 échantillonnages par points) seule la moyenne des résultats pour chaque point sera prise en compte.

Les valeurs moyennes des comptages et la conformité avec la classification requise sont données le plus souvent directement par l'appareil.

Aérobiocontamination

Objectifs

Ils sont doubles :

- quantifier les micro-organismes de la flore aérobie revivifiable présents dans le prélèvement d'air,
- isoler un éventuel micro-organisme pathogène, l'identifier et le quantifier.

Conformité du prélèvement

Les boîtes de Pétri contenant les géloses ayant servi aux prélèvements sont fermées et :

- ont été acheminées le plus rapidement possible au laboratoire à température ambiante (sans réfrigération et avec un délai maximum de 24 heures),
- sont identifiées conformément à la fiche de prélèvement dûment complétée qui les accompagnent.

Enregistrement du prélèvement

Il est effectué au laboratoire suivant un mode opératoire écrit et permet l'édition des étiquettes d'identification des prélèvements ainsi que de la liste de travail.

Matériel

- Étuves :
 - à $30 \pm 2^{\circ}\text{C}^{59}$ pour la FAR,
 - à $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ pour les recherches ciblées de fongiques.
- Milieux de culture : Le choix des milieux de culture et des conditions d'incubation (température, durée, atmosphère) se fait en fonction des micro-organismes recherchés. En routine, on utilise un milieu non sélectif pour la flore bactérienne totale (milieu « tout germe » : bactéries et champignons) et, si besoin, un milieu spécifique pour une recherche ciblée de flore fongique (cf annexe 4). Des milieux sélectifs peuvent être utilisés pour des recherches bactériennes ciblées, notamment en cas d'épidémie.
- Table de conversion du biocollecteur⁶⁰ (si besoin).

Technique

- Incubation : Incuber les géloses pour recherche de FAR à $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$, et celles pour la recherche ciblée de fongiques à $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ pendant 5 à 7 jours.

⁵⁹ La norme (NF S90-351) préconise une température de 30°C , l'écart de $\pm 2^{\circ}\text{C}$ rajouté ici facilite la gestion de la métrologie sans modifier les résultats de la culture.

⁶⁰ Table de conversion : La probabilité que 2 micro-organismes (proches sur la gélose) donnent naissance à une seule colonie observable est d'autant plus importante que le nombre de colonies observé est grand. C'est pourquoi, pour le rendu des résultats, il faut prendre en compte la "conversion" soit directe sur l'appareil soit à l'aide d'une table fournie par le fabricant du biocollecteur.

- Recherche bactériologique :
 - 1^{ère} lecture : après 48 à 72 heures d'incubation :
 - * dénombrer la flore totale aérobie en dénombrant toutes les colonies présentes sur la gélose,
 - * identifier les bactéries potentiellement pathogènes avec les techniques usuelles de bactériologie,
 - * si présence de levures et/ou de champignons filamenteux : identifier toute colonie suspecte d'être un *Aspergillus* et confirmer l'identification ;
 - * les géloses sont ré incubées⁶¹ (5 à 7 jours en tout) : Attention ! si présence de champignon(s), risque d'envahissement de la gélose.
 - 2^{ème} lecture : après 5 à 7 jours d'incubation :
 - * dénombrer la flore totale aérobie qui a pu évoluer depuis la 1^{ère} lecture et, si de nouvelles colonies de bactéries potentiellement pathogènes sont apparues, les identifier comme précédemment,
 - * rechercher à nouveau la présence de levures et/ou de champignons filamenteux et procéder comme pour la 1^{ère} lecture.
- Recherche ciblée de fongique :
 - 1^{ère} lecture : après 48 à 72 heures d'incubation :
 - * dénombrer les levures et/ou les champignons filamenteux : identifier toute colonie suspecte d'être un *Aspergillus* et confirmer l'identification,
 - * si absence de champignons, les géloses sont ré incubées⁶² (5 à 7 jours en tout).
 - 2^{ème} lecture : après 5 à 7 jours d'incubation :
 - * rechercher à nouveau la présence de levures et/ou de champignons filamenteux et procéder comme pour la 1^{ère} lecture.

Résultats

- Le dénombrement des colonies est exprimé en UFC/m³ (extrapolé, si besoin, à partir de la table de conversion ou « abaque » de l'appareil utilisé).
- L'aspect qualitatif est noté en fonction de la présence ou non de micro-organismes potentiellement pathogènes.
- Les résultats sont validés par un responsable habilité du laboratoire de microbiologie de l'environnement. Ils sont rendus « conformes » ou « non conformes » par rapport aux valeurs cibles définies dans le contrat (cf. CCTP) et/ou les protocoles de l'ES. Ils sont confidentiels et transmis aux destinataires exclusifs suivant le mode d'envoi prévu au CCTP. L'archivage des résultats est décrit en annexe 6.

Tableau 1 : Liens hypertextes par thème				
GENERALITES (communes aux 4 thèmes)	Chapitre 1 Stratégie (p 17)	Chapitre 3 Prélèvement (p 41)	Chapitre 4 Analyse (p 720)	Chapitre 5 Interprétation (p 84)
AIR	Stratégie (p 21)	Prélèvement CP (p 45) Aerobio (p 50)	Analyse (p 73)	Interprétation (p 86)
EAU	Stratégie (p 25)	Prélèvement (p 54)	Analyse (p 75)	Interprétation (p 90)
SURFACES	Stratégie (p 28)	Prélèvement (p 60)	Analyse (p 78)	Interprétation (p 92)
ENDOSCOPES	Stratégie (p 31)	Prélèvement (p 64)	Analyse (p 81)	Interprétation (p 95)

⁶¹ Si des champignons sont présents à la 1^{ère} lecture (*Aspergillus*) : ne pas ré incubé car les spores de cette primo culture ont pu se disséminer sur la gélose lors des manipulations pour la lecture et le comptage final serait faussé par l'apparition de colonies secondaires.

⁶² Si des champignons sont présents à la 1^{ère} lecture (*Aspergillus*) : ne pas ré incubé car les spores de cette primo culture ont pu se disséminer sur la gélose lors des manipulations pour la lecture et le comptage final serait faussé par l'apparition de colonies secondaires.

EAU : analyse - méthodes et résultats

Objectifs

Ils sont adaptés à la recherche demandée soit :

- quantifier les micro-organismes de la flore aérobie revivifiable présents dans le prélèvement et isoler un éventuel micro-organisme pathogène, l'identifier et le quantifier,
- rechercher et quantifier des micro-organismes ciblés soit dans le cadre réglementaire (potabilité, légionelles...), soit dans le cadre d'une investigation (épidémie suspectée d'être d'origine hydrique...).

Rappel : Le contrôle de l'eau du réseau de distribution (c'est à dire au niveau du compteur d'eau desservant l'établissement) relève de la responsabilité du distributeur. L'information sur la qualité de l'eau potable du réseau publique doit être prise en mairie, d'autant plus quand la commune possède un Service Communal d'Hygiène et de Santé (SCHS).

Conformité du prélèvement

Les flacons contenant les échantillons sont correctement remplis, fermés, et :

- ont été acheminés en conformité avec le protocole de transport validé par le laboratoire,
- sont identifiés conformément à la fiche de prélèvement complétée qui les accompagnent.

Enregistrement du prélèvement

Il est effectué au laboratoire suivant un mode opératoire écrit et permet l'édition des étiquettes d'identification des prélèvements ainsi que de la liste de travail.

Matériel

- Rampe de filtration ;
- Membranes filtrantes stériles ;
- Etuves à $22 \pm 2^\circ\text{C}$; à $36 \pm 2^\circ\text{C}$;
- Poste de sécurité microbiologique (PSM) souhaitable (comme pour les solutions de substitution en hémofiltration) ;
- Milieux de culture choisis en fonction de la recherche à effectuer :
 - imposé quand la réglementation donne des valeurs de référence (ex : *Legionella*),
 - obligatoirement ceux indiqués par la norme quand la technique utilisée fait référence à celle-ci sauf à avoir validé une technique équivalente : il s'agit dans ce cas d'une méthode interne qui implique que le laboratoire ne peut pas faire référence à la norme dans le résultat.

Remarque : Les milieux « minimum » ou milieux « pauvres » (contenant seulement les éléments strictement indispensables à la croissance des bactéries) sont le plus souvent utilisés pour le dénombrement des bactéries environnementales (cf annexe 4).

Techniques (d'après la norme NF EN ISO 8199)

- Ensemencement :
 - Par filtration sur membrane :
 - * prévoir au moins 1 ensemencement par température d'incubation,
 - * pour chaque ensemencement :
 - filtrer l'échantillon sur une membrane filtrante stérile de composition et de diamètre de pore nominal conforme à la norme utilisée (ex : nitrate de cellulose, 0,45 µm) montée dans un dispositif de filtration positionné de préférence dans un PSM,
 - déposer la membrane (face non filtrante) sur le milieu gélosé contenu dans une boîte de Pétri en veillant à ne pas emprisonner d'air,
 - après incubation, dénombrer les colonies et les identifier si besoin ;
 - Par incorporation en milieu gélosé :
 - * prévoir au moins 1 ensemencement par température d'incubation,
 - * pour chaque ensemencement :
 - faire liquéfier le milieu puis le maintenir à $45 \pm 1^\circ\text{C}$,
 - déposer au fond d'une boîte de Pétri un volume d'essai n'excédant pas 2 mL, rajouter 15 à 20 mL de milieu liquide et mélanger l'ensemble par rotations lentes,
 - après incubation, dénombrer les colonies (l'identification est rendue difficile car les colonies sont incluses dans la gélose).

Remarque : La dilution en milieu liquide (technique du NPP : nombre le plus probable), peu utilisée en hygiène hospitalière, est applicable en particulier aux eaux chargées en matières en suspension.

- Température, durée d'incubation et atmosphère d'incubation (tableau 18) :
Ce sont des paramètres importants qui interfèrent directement sur la croissance des micro-organismes. Quand des niveaux cibles sont réglementaires, ces paramètres sont imposés soit directement dans les textes réglementaires soit dans la (les) norme(s) qui est (sont) référencées dans le(s) texte(s). L'incubation est classiquement en atmosphère aérobie mais pour certaines recherches particulières il peut y avoir nécessité soit d'une atmosphère anaérobie soit d'une atmosphère enrichie en CO₂.
- La lecture des cultures et l'identification des micro-organismes indicateurs :
La lecture des milieux ensemencés et les identifications des micro-organismes indicateurs doivent être réalisées en suivant strictement les protocoles indiqués dans la norme quand la technique utilisée fait référence à celle-ci. Si le laboratoire utilise une autre technique, il doit l'avoir validée : il s'agit donc d'une méthode interne qui implique que le laboratoire ne peut pas faire référence à la norme dans le résultat.

Résultats

Les résultats doivent inclure *a minima* : le référentiel (norme...) ou à défaut la technique d'ensemencement, le milieu utilisé, la température et durée d'incubation utilisés.

Ils sont rendus en UFC/volume filtré pour chaque température d'incubation.

Les principaux paramètres recherchés sont rapportés dans le tableau 20.

Les résultats sont validés par un responsable habilité du laboratoire de microbiologie de l'environnement. Ils sont rendus « conformes » ou « non conformes » par rapport aux valeurs cibles définies dans le contrat (cf CCTP) et/ou les protocoles de l'ES. Ils sont confidentiels et transmis aux destinataires exclusifs suivant le mode d'envoi prévu au CCTP. L'archivage des résultats est décrit en annexe 6.

Tableau 20 : Principaux paramètres recherchés pour le contrôle microbiologique de l'eau			
Paramètres	Normes ou réglementation	Techniques	Milieux d'isolement (exemples)
Dénombrement des micro-organismes revivifiants à 22°C et 36°C (FAR)	NF EN ISO 6222 (1999)	Ensemencement par incorporation • 22 ± 2°C – 68 ± 4 h • 36 ± 2°C – 44 ± 4 h Dénombrement des colonies	Milieu « minimum » type TGEA, R2A ou PCA (sans glucose)
	NF EN 8199 (2008)	Filtration sur membrane 0,45 µm • 22 ± 2°C – 68 ± 4 h • 36 ± 2°C – 44 ± 4 h Dénombrement des colonies	
Dénombrement des micro-organismes revivifiants à 22°C (FAR) dans la cadre d'une activité de dialyse	Circulaires du 20 juin 2000, du 30 janvier 2007 Norme NF S93-315 (2008)	Filtration sur membrane 0,45 µm Température d'incubation : 20 – 22°C Durée minimale : 7 jours	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NF EN 16266 (2008)	Filtration sur membrane 0,45 µm, incubation à 36 ± 2°C – 44 ± 4 h Dénombrement des colonies confirmées	Pseudo CN
<i>Legionella</i>	NF T90-431 (2014)	Ensemencement direct et après concentration par filtration sur membrane ⁶³ ou centrifugation (eaux sales) Incubation; 36 ± 2°C ; 8 à 11 j Dénombrement et confirmation des <i>Legionella</i> et dénombrement et identification des <i>L. pneumophila</i>	GVPC
Bactéries coliformes <i>E. coli</i>	NF EN ISO 9308-1 (2000)	Essai standard : filtration sur membrane 0,45 µm Incubation à 36 ± 2°C ; 21 ± 3 h Dénombrement des colonies confirmées	Gélose lactosée au TTC-Tergitol (a)
<i>S. aureus</i>	XP T 90-412 (2006)	Filtration sur membrane 0,45 µm Incubation à 36 ± 2°C ; 44 ± 4 h Dénombrement des colonies confirmées	Chapman Baird Parker
Entérocoques intestinaux	NF EN ISO 7899-2 (2000)	Filtration sur membrane 0,45 µm 36 ± 2°C – 44 ± 4 h Dénombrement des colonies confirmées	Slanetz et Bartley
Spoires de micro-organismes anaérobies sulfito-réducteurs (b)	NF EN ISO 26461-2 (1993) (c)	Destruction des formes végétatives Filtration sur membrane 0,20 µm Incubation à 37 ± 1°C ; 20 ± 4 h – 44 ± 4 h en anaérobiose, dénombrement des colonies caractéristiques	Milieu sélectif (sulfite, fer)

a) TTC-Tergitol : TTC = Chlorure de 2,3,5-triphényltétrazolium, Tergitol : Heptadécylsulfate de sodium

b) pour les eaux d'origine superficielle ou influencées par une eau d'origine superficielle,

c) la norme NF T90-415 propose une méthode en tube par incorporation en gélose.

Tableau 1 : Liens hypertextes par thème				
GENERALITES (communes aux 4 thèmes)	Chapitre 1 Stratégie (p 17)	Chapitre 3 Prélèvement (p 41)	Chapitre 4 Analyse (p 720)	Chapitre 5 Interprétation (p 84)
AIR	Stratégie (p 21)	Prélèvement CP (p 45) Aerobio (p 50)	Analyse (p 73)	Interprétation (p 86)
EAU	Stratégie (p 25)	Prélèvement (p 54)	Analyse (p 75)	Interprétation (p 90)
SURFACES	Stratégie (p 28)	Prélèvement (p 60)	Analyse (p 78)	Interprétation (p 92)
ENDOSCOPES	Stratégie (p 31)	Prélèvement (p 64)	Analyse (p 81)	Interprétation (p 95)

⁶³ Pour les eaux propres sur membranes en nitrate de cellulose ou en esters de cellulose de diamètre moyen de pores 0,45 µm, d'environ 47 mm de diamètre.

Pour les eaux sales, préparation d'un concentrat soit par filtration sur membrane en polycarbonate de diamètre moyen de pores 0,4 µm, d'environ 47 mm de diamètre soit par centrifugation avec reprise du culot dans un faible volume.

SURFACES : analyse - méthodes et résultats

Objectifs

Ils sont doubles :

- quantifier les micro-organismes de la flore aérobie revivifiable présents dans l'échantillon,
- isoler un éventuel micro-organisme pathogène, l'identifier et le quantifier.

Conformité du prélèvement

- Délai de transport :
 - géloses contact : température ambiante (ne pas réfrigérer), délai maximum : 24 heures,
 - écouvillons : température ambiante pendant 4h puis $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ jusqu'à 24h.
- Contenants :
 - intègres,
 - identifiés conformément aux fiches de prélèvement dûment complétées qui les accompagnent.
- Neutralisants des produits détergents désinfectants utilisés pour le bionettoyage :
 - géloses contact : incorporé dans le milieu de culture,
 - écouvillons : incorporé dans le diluant pour l'humidification de l'écouvillon.

Pour s'assurer de la neutralisation des produits détergent-désinfectants dont des résidus peuvent subsister sur les surfaces prélevées et contrarier la croissance des micro-organismes prélevés.

Enregistrement du prélèvement

Il est effectué au laboratoire suivant un mode opératoire écrit et permet l'édition des étiquettes d'identification des prélèvements ainsi que de la liste de travail.

Matériel

- Étuves :
 - à $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$ pour la FAR (y compris les champignons),
 - à $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ pour les recherches ciblées de fongiques ;
- Milieux de culture : pauvres type TSA ou PCA.
Des milieux sélectifs peuvent être utilisés pour des recherches ciblées, notamment en cas d'épidémie.

Remarque : Les résultats observés avec le milieu PCA n'étant pas exactement les mêmes qu'avec le milieu TSA, il convient de choisir un des milieux de culture et continuer à utiliser ce milieu lors des analyses suivantes afin de pouvoir comparer les résultats dans le temps.

Technique et résultats

Méthode par empreintes gélosées (boîtes contact)

- Température et temps d'incubation :
 - $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$ pour la FAR (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.
 Dans un contexte d'épidémie dont on soupçonne une origine environnementale, des conditions atmosphériques et des durées d'incubation et des milieux spécifiques peuvent s'avérer nécessaires.

- Lecture :

▪ Recherche FAR :

- * 1^{ère} lecture : après 48 à 72 heures d'incubation :
 - dénombrer la flore totale aérobie en dénombrant toutes les colonies présentes sur la gélose (figure 18) ;
 - identifier les bactéries potentiellement pathogènes avec les techniques usuelles de bactériologie ;
 - si présence de levures et/ou de champignons filamenteux : identifier toute colonie suspecte d'être un *Aspergillus* et confirmer l'identification ;
 - les géloses sont ré incubées⁶⁴ (5 à 7 jours en tout) : Attention ! si présence de champignon(s), risque d'envahissement de la gélose ;
- * 2^{ème} lecture : après 5 à 7 jours d'incubation :
 - dénombrer la flore totale aérobie qui a pu évoluer depuis la 1^{ère} lecture et, si de nouvelles colonies de bactéries potentiellement pathogènes sont apparues, les identifier comme précédemment ;
 - rechercher à nouveau la présence de levures et/ou de champignons filamenteux et procéder comme pour la 1^{ère} lecture ;

▪ Recherche ciblée de fongiques :

- * 1^{ère} lecture : après 48 à 72 heures d'incubation :
 - dénombrer les levures et/ou les champignons filamenteux : identifier toute colonie suspecte d'être un *Aspergillus* et confirmer l'identification,
 - si absence de champignons, les géloses sont ré incubées (5 à 7 jours en tout) ;
- * 2^{ème} lecture : après 5 à 7 jours d'incubation :
 - rechercher à nouveau la présence de levures et/ou de champignons filamenteux et procéder comme pour la 1^{ère} lecture ;



a



b

Figure 21 : Boite contact après incubation

(a : présence de colonies à quantifier, b : absence de colonie)

- Résultats :

Ils sont :

- quantitatifs : nombre d'UFC/25 cm²⁶⁵,
- qualitatifs si nécessaire : identification de micro-organismes potentiellement pathogènes.

Ils sont soit :

- normatifs : si conditions de prélèvement et de culture « standardisées », validées et reproductibles (surface plane, prélèvement et conditions de cultures normés),
- non normatifs : si conditions de prélèvement « simplifiées » c'est-à-dire protocolées mais hors cadre normatif (surface irrégulière, poids de 200 g, pression manuelle sur la boite contact...).

Ils sont validés par un responsable habilité du laboratoire de microbiologie de l'environnement. Ils sont rendus « conformes » ou « non conformes » par rapport aux valeurs cibles définies dans le contrat (cf CCTP) et/ou les protocoles de l'ES. Ils sont confidentiels et transmis aux destinataires exclusifs suivant le mode d'envoi prévu au CCTP. L'archivage des résultats est décrit en annexe 6.

⁶⁴ Si des champignons sont présents à la 1^{ère} lecture (*Aspergillus*) : ne pas ré incubé car les spores de cette primo culture ont pu se disséminer sur la gélose lors des manipulations pour la lecture et le comptage final serait faussé par l'apparition de colonies secondaires.

⁶⁵ La surface de 25 cm² ne correspond pas à la surface de la boite contact mais à l'empreinte de la gélose sur la surface (aplatissement de la surface convexe de la gélose).

Méthode par écouvillonnage

- Conditions de culture
L'ensemencement est réalisé soit :
 - directement par épuisement de l'écouvillon sur le(s) milieu(x) choisi(s) ;
 - après déchargement(s) : $\pm$ dilutions si on présume que le nombre de micro-organismes sera élevé et ensemencements sur le(s) milieu(x) choisi(s) ;
 - après enrichissement : pour une recherche ciblée, il est possible d'effectuer un enrichissement en bouillon sélectif puis ensemencer sur milieu(x) adapté(s). (recherche d'ERV après enrichissement dans un bouillon VRE par exemple) ;
- Température et temps d'incubation
 - $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$ pour la FAR (y compris flore fongique) pendant 5 à 7 jours,
 - $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ pour une recherche ciblée de flore fongique pendant 5 à 7 jours.

Dans un contexte d'épidémie dont on soupçonne une origine environnementale, des conditions atmosphériques et des durées d'incubation et des milieux spécifiques peuvent s'avérer nécessaires.
- Lecture : même méthode que pour les empreintes gélosées.
- Résultats
Ils sont :
 - qualitatifs : présence/absence,
 - quantitatifs (utilisation d'un gabarit), exprimés en nombre d'unité formant colonie par surface prélevée. Ils s'expriment en UFC/surface prélevée (au moins 20 cm² d'après la norme NF EN ISO 14698-1 (2004)).

Les résultats sont validés par un responsable habilité du laboratoire de microbiologie de l'environnement (norme NF EN ISO/CEI 17025 (2005)). Ils sont rendus « conformes » ou « non conformes » par rapport aux valeurs cibles définies dans le contrat (cf CCTP) et/ou les protocoles de l'ES. Ils sont confidentiels et transmis aux destinataires exclusifs suivant le mode d'envoi prévu au CCTP. L'archivage des résultats est décrit en annexe 6.

Tableau 1 : Liens hypertextes par thème				
GENERALITES (communes aux 4 thèmes)	Chapitre 1 Stratégie (p 17)	Chapitre 3 Prélèvement (p 41)	Chapitre 4 Analyse (p 720)	Chapitre 5 Interprétation (p 84)
AIR	Stratégie (p 21)	Prélèvement CP (p 45) Aerobio (p 50)	Analyse (p 73)	Interprétation (p 86)
EAU	Stratégie (p 25)	Prélèvement (p 54)	Analyse (p 75)	Interprétation (p 90)
SURFACES	Stratégie (p 28)	Prélèvement (p 60)	Analyse (p 78)	Interprétation (p 92)
ENDOSCOPES	Stratégie (p 31)	Prélèvement (p 64)	Analyse (p 81)	Interprétation (p 95)

ENDOSCOPIE : analyse - méthodes et résultats

Rappel : Les mycobactéries (y compris atypiques) et les légionelles ne sont pas recherchées en dehors d'investigations dans un contexte épidémiologique.

Attention : Une instruction est en cours de rédaction et sera publiée en 2016. C'est un document unique qui concerne le traitement des endoscopes souples thermosensibles. Dès sa parution, ce texte sera la référence réglementaire à appliquer.

Les endoscopes

Objectifs

- Quantifier les micro-organismes de la flore aérobie revivifiable présents dans l'échantillon,
- Isoler un éventuel micro-organisme pathogène, l'identifier et le quantifier.

Conformité du prélèvement

Les prélèvements sont conformes s'ils :

- ont été acheminés le plus rapidement possible (dans les 2 heures) au laboratoire à température ambiante sinon ils ont été maintenus à $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ dans l'attente de l'analyse pour une durée maximale de 24 h ;
- sont identifiés conformément à la fiche de prélèvement complétée qui les accompagne (cf fiche technique prélèvement) ;
- sont validés par la mesure, au laboratoire, du volume recueilli qui est $\geq 80\%$ du volume injecté.

Enregistrement du prélèvement

Il est effectué au laboratoire suivant un mode opératoire écrit et permet l'édition des étiquettes d'identification des prélèvements ainsi que de la liste de travail.

Matériel

- Rampe de filtration ;
- Membrane filtrantes stériles ;
- Etuves à $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$;
- Poste de sécurité microbiologique (PSM) souhaitable (notamment pour l'analyse des prélèvements des endoscopes de haut niveau) ;
- Milieu de culture : non sélectif (PCA sans glucose ou TSA, adapté à la croissance de la flore mésophile aérobie (FAR) et d'une contamination humaine résiduelle) :
 - **Remarque** : Les résultats observés avec le milieu PCA n'étant pas exactement les mêmes qu'avec le milieu TSA, il convient de choisir un des milieux de culture et continuer à utiliser ce milieu lors des analyses suivantes afin de pouvoir comparer les résultats dans le temps.

Technique

- Ensemencement :
 - filtrer la totalité du liquide recueilli sur une membrane filtrante stérile (nitrate de cellulose⁽³⁾), de diamètre de pore nominal de $0,45 \mu\text{m}$, montée dans un dispositif de filtration positionné de préférence dans un PSM,
 - rincer avec de l'eau stérile pour éliminer la solution de prélèvement (3 fois le volume filtré),
 - transférer les membranes sur le milieu de culture non sélectif choisi (PCA ou TSA).
- Incubation : $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$, en aérobiose pendant 5 jours⁽³⁾.

- Lecture⁽³⁾
 - à 48 h, 72 h et jusqu'à 5 jours en cas de culture stérile,
 - dénombrer les colonies,
 - identifier les colonies si l'aspect est compatible avec les micro-organismes indicateurs prédéfinis et/ou potentiellement pathogènes (cf tableau interprétation) ou si la flore est monomorphe.

Résultats

Les résultats sont :

- quantitatifs : nombre d'UFC soit par endoscope dans le cas d'un prélèvement global de tous les canaux, soit par canal investigué dans le cas d'un prélèvement canal par canal ;
- qualitatifs : présence ou absence dans l'endoscope des micro-organismes indicateurs recherchés ;
- validés par un responsable habilité du laboratoire de microbiologie de l'environnement. Ils sont rendus « conformes » ou « non conformes » par rapport aux valeurs cibles définies dans le contrat (cf CCTP) et/ou les protocoles de l'ES. Ils sont confidentiels et transmis aux destinataires exclusifs (sans oublier le service d'endoscopie) suivant le mode d'envoi prévu au CCTP et/ou les protocoles de l'ES. L'archivage des résultats est décrit en annexe 6.

Eau en endoscopie

Il n'y a pas de spécificités pour l'analyse des eaux en endoscopie : les méthodes d'analyse décrites dans le tableau 19 (chapitre analyse de l'eau, page 77) sont applicables et concernent⁽²¹⁾ :

- eau pour soins standard (eau du réseau) :
 - eau d'alimentation des LDE ou des postes de lavage des endoscopes,
 - eau immédiatement après le système de pré-traitement s'il existe (pré-filtres, UV, ...) et si besoin eau de rinçage intermédiaire ;
- eau bactériologiquement maîtrisée : eau de rinçage terminal utilisée soit en procédure de traitement manuel des endoscopes ou dans un LDE.

Remarque : Les eaux stériles utilisées pour le rinçage terminal lors d'une désinfection de haut niveau sont contrôlées par le fabricant et ne nécessitent pas de nouveaux contrôles.

ESET

Prélèvements de surfaces

Il n'y a pas de spécificités (cf chapitre analyse des surfaces).

Les prélèvements sont incubés à $30 \pm 2^\circ\text{C}$ pour la FAR pendant 5 à 7 jours.

Les résultats sont exprimés :

- en quantitatif : nombre d'UFC/25 cm²⁶⁶,
- en qualitatif si nécessaire : identification de micro-organismes potentiellement pathogènes.

⁶⁶ La surface de 25 cm² ne correspond pas à la surface de la boîte contact mais à l'empreinte de la gélose sur la surface (aplatissement de la surface convexe de la gélose)

Prélèvements microbiologiques d'air

Les prélèvements microbiologiques peuvent être réalisés par impaction ou sédimentation (tableau 21).

Les résultats sont exprimés :

- en quantitatif :
 - UFC/surface si boîte de sédimentation en précisant la durée de prélèvement,
 - UFC/m³ si prélèvement par impaction,
- en qualitatif si nécessaire : identification de micro-organismes potentiellement pathogènes.

Concernant la propreté particulière, si le fabricant revendique une propreté particulière de l'air circulant dans l'ESET, des mesurages de la propreté particulière peuvent être réalisés pour vérifier si la classe atteinte est conforme à ces revendications en suivant les normes appropriées (ISO/DIS 14644-1 (2014)). Pour les ESET contenant plusieurs compartiments alimentés par une même source d'air, il convient de réaliser des essais sur un des compartiments (Norme NF S 98-030 (2012)).

Les résultats sont validés par un responsable habilité du laboratoire de microbiologie de l'environnement. Ils sont rendus « conformes » ou « non conformes » par rapport aux valeurs cibles définies dans le contrat (cf CCTP) et/ou les protocoles de l'ES. Ils sont confidentiels et transmis aux destinataires exclusifs (sans oublier le service d'endoscopie) suivant le mode d'envoi prévu au CCTP et/ou les protocoles de l'ES. L'archivage des résultats est décrit en annexe 6.

Tableau 21 : Contrôle de l'air dans les ESET en fonction des normes				
Norme	NF S 98-030 (2012)		NF EN 16442 (2015)	
Prélèvement par	Impaction	Sédimentation	Impaction	Sédimentation
Matériel	Biocollecteur si volume de l'enceinte et débit d'air le permettent	Dispositif passif : milieu PCA (validé pour la sédimentation)	Bio collecteur	Dispositif passif : milieu TSA (validé pour la sédimentation)
Méthode	Pas de méthode décrite	1 boîte de gélose de 90 mm de diamètre, milieu PCA ouverte au fond de l'enceinte, portes fermées, durant 2 h	Prélever 1 m ³ sur milieu TSA	4 boîtes de gélose de 90 mm de diamètre, milieu TSA exposées pendant 1 heure dans l'enceinte.
Incubation		30 ± 1°C pendant 5 jours	30 ± 1°C pendant 5 jours	
Lecture,		Lecture à J5	Lecture à J5	
Résultats		en UFC par boîte	en UFC/m ³	en UFC/ boîte
Interprétation (valeur cible)	Classe revendiquée par le fabricant	< 25 UFC par boîte et absence de MO pathogène	< 100 UFC/m ³ et absence de MO pathogène	Somme des 4 boîtes < 50 UFC et absence de MO pathogène

Tableau 1 : Liens hypertextes par thème				
GENERALITES (communes aux 4 thèmes)	Chapitre 1 Stratégie (p 17)	Chapitre 3 Prélèvement (p 41)	Chapitre 4 Analyse (p 720)	Chapitre 5 Interprétation (p 84)
AIR	Stratégie (p 21)	Prélèvement CP (p 45) Aerobio (p 50)	Analyse (p 73)	Interprétation (p 86)
EAU	Stratégie (p 25)	Prélèvement (p 54)	Analyse (p 75)	Interprétation (p 90)
SURFACES	Stratégie (p 28)	Prélèvement (p 60)	Analyse (p 78)	Interprétation (p 92)
ENDOSCOPES	Stratégie (p 31)	Prélèvement (p 64)	Analyse (p 81)	Interprétation (p 95)

Chapitre 5

L'interprétation des résultats

Points importants

La déclaration de conformité des résultats est effectuée au laboratoire par un responsable technique du laboratoire de microbiologie de l'environnement habilité (norme NF EN ISO/CEI 17025 (2005)).

Cette déclaration de conformité par rapport à une valeur cible prédéfinie (CCTP) est la première étape de l'interprétation des résultats et est indissociable des conditions de prélèvement.

L'interprétation des résultats dans le contexte de l'ES est effectuée par l'EOH (avec l'aide éventuelle du laboratoire) de manière :

- « ponctuelle » au fur et à mesure de l'arrivée des résultats ou au moment d'une alerte par le laboratoire pour non-conformité avant le résultat définitif ;
- « suivie » en colligeant les résultats sous forme de tableau de bord pour une vision globale sur une durée déterminée (année, durée d'une campagne de prélèvements...).

La détermination de valeurs « alerte » et « action » peut être un outil utile pour l'interprétation des résultats et la mise en place d'actions correctrices si besoin.

La conduite à tenir en cas de résultats non conformes est coordonnée par l'EOH et/ou le CLIN et n'est pas abordée dans ce document.

Tableau 1 : Liens hypertextes par thème				
GENERALITES (communes aux 4 thèmes)	Chapitre 1 Stratégie (p 17)	Chapitre 3 Prélèvement (p 41)	Chapitre 4 Analyse (p 720)	Chapitre 5 Interprétation (p 84)
AIR	Stratégie (p 21)	Prélèvement CP (p 45) Aerobio (p 50)	Analyse (p 73)	Interprétation (p 86)
EAU	Stratégie (p 25)	Prélèvement (p 54)	Analyse (p 75)	Interprétation (p 90)
SURFACES	Stratégie (p 28)	Prélèvement (p 60)	Analyse (p 78)	Interprétation (p 92)
ENDOSCOPES	Stratégie (p 31)	Prélèvement (p 64)	Analyse (p 81)	Interprétation (p 95)

Air : Interprétation des résultats

L'interprétation des résultats du contrôle microbiologique et du comptage particulaire de l'air **nécessite a minima** la concertation entre les services techniques et l'EOH. Leur collaboration permet de prendre en compte l'ensemble des paramètres physiques et microbiologiques dont dépend la maîtrise d'une ZEM.

Rappel des principaux critères d'interprétation des contrôles de l'air

Association des contrôles particuliers et microbiologiques

Ces deux types de contrôles sont complémentaires. **Il n'y a pas de corrélation parfaite entre le nombre de particules et le nombre de micro-organismes dans l'air** ⁽²¹⁾. Le contrôle particulaire est plus facile à mettre en œuvre, plus réactif et fait référence à des normes bien établies qui permettent d'évaluer l'intégrité de la filtration et la maîtrise de la ZEM. Le contrôle microbiologique a pour intérêt de mettre en évidence des micro-organismes potentiellement à l'origine de contamination, mais nécessite un délai pour l'obtention des résultats et son interprétation est délicate en l'absence de techniques de références.

Niveaux cibles pour les contrôles de l'air dans les zones à risque dans les ES

Les niveaux cibles fournis par les normes (tableaux 22 et 23) sont valables pour des installations hors activité et hors présence humaine or la principale source de contamination aéroportée est l'homme aussi certaines réglementation ⁽¹²⁾ ou recommandations incluent des niveaux cibles pour les zones en activité (tableau 24). Chaque établissement de santé doit évaluer les risques liés aux activités pratiquées et aux types de patients pris en charge et définir pour chaque zone le niveau de risque approprié.

Les valeurs obtenues sont à comparer aux niveaux cibles prédéfinis, mais également entre elles au même point dans le temps afin de faire un suivi de tendance. En cas d'écart par rapport aux limites établies, une action corrective doit être engagée. Le dénombrement microbien est soumis au manque de reproductibilité ce qui doit rendre les interprétations prudentes.

Dans le cas d'une étude qualitative microbiologique, utilisée notamment en cas d'épidémie, les résultats sont rendus en présence ou absence du pathogène spécifiquement recherché.

Tableau 22 : Tableau récapitulatif des niveaux cibles recommandés en comptage particulaire pour l'air dans les établissements de santé suivant la norme NF S90-351 (2013) et NF EN ISO 14644-1 et 2 (2016) (au repos et hors présence humaine)

Classe de risque		4	4-3	3	2	1*
Niveau de risque		Très haut	Haut +	Haut	Modéré	Faible ou négligeable
Classe particulaire		ISO 5	ISO 6**	ISO 7	ISO 8	_ *
Concentration maximale admissible en particule > ou égale	5 µm	***	293	2 930	29 300	
	0,5 µm	3 520	35 200	352 000	3 520 000	
Classe de cinétique d'élimination des particules à 0,5 µm (CP _{0.5})		5	-	10	20	
Temps nécessaire pour obtenir 90% de la décontamination (en minutes)		≤5	-	≤10	≤20	

* La zone 1 correspond à des locaux non spécifiques et n'a pas d'objectif de classe particulaire.

** La classe particulaire ISO 6 n'est pas prise en compte dans les recommandations pour les ES et le CP_{0.5} n'est pas spécifié dans la norme NF S90-351 (2013) pour cette classe.

*** Pour la classe ISO 5 : les limites de l'échantillonnage et de l'exploitation statistique des résultats rendent inappropriés la mesure des particules de taille ≥ 5 µm du fait de leur faible quantité dans cette classe de risque.

Tableau 23 : Tableau récapitulatif des niveaux cibles recommandés en aérobiocontamination pour l'air dans les établissements de santé par la norme NF S90-351 (avril 2013) et NF EN ISO 14698-2 (2004) (au repos et hors présence humaine)

Classe de risque	4	3	2	1*
Niveau de risque	Très haut	Haut	Modéré	Faible ou négligeable
Classe microbiologique **	M1	M10	M100	_*
Nombre maximum d'UFC/m ³	≤ 1	10	100	

* La zone 1 correspond à des locaux non spécifiques et n'a pas d'objectif de classe bactériologique.

** le « M » de classe « bactériologique » prend en compte les bactéries et les champignons.

Tableau 24 : Classification de la propreté de l'air (particulaire et microbiologique) dans les établissements de santé suivant les référentiels de la pharmacie, la stérilisation et de la thérapie cellulaire ^{(13) (16) (10) (11) (12)}

CLASSE		A	B	C	D	
Comptage particulaire						
AU REPOS	Concentration maximale admissible en particule > ou égale ^(a)	5 µm	20	29	2 900	29 000
		0,5 µm	3 520	3 520	352 000	3 520 000
EN ACTIVITE	Concentration maximale admissible en particule > ou égale ^(a)	5 µm	29	2 900	29 000	Non définie ^(b)
		0,5 µm	3 520	352 000	3 520 000	Non définie ^(b)
Classe de cinétique d'élimination des particules à 0,5 µm CP _(0.5)			15 à 20 ^(c)			
Temps nécessaire pour obtenir 90% de la décontamination (en minutes)			15 à 20 ^(c)			
Aérobiocontamination en ACTIVITE ^(d)						
Nombre maximum d'UFC/m ³			<1	10	100	200

^(a) Pour la pharmacie et la stérilisation les particules de 1 µm sont également prises en compte (cf fiches 4 p 103 et 6 p106)

^(b) Pour la classe D en activité, la limite de contamination particulaire est à définir par l'établissement ou l'organisme autorisé. Cette limite est fondée sur une analyse historique des résultats enregistrés et permet la mise en évidence du niveau de contamination.

^(c) Seules les bonnes pratiques de TC de 2010 ⁽¹²⁾ précise le CP_{0.5}

^(d) Dans tous les cas la présence champignons est considérée comme une non-conformité et des mesures correctives sont mises en place.

Remarque : Les particules de 5µm sont encore référencées dans les BPP, les BPPH et les bonnes pratiques de Thérapie cellulaire pour les classes A et B cependant elles ne sont plus préconisées dans la norme NF EN ISO 14644-1 et 2 (2016).

Interprétation dans le cadre d'une surveillance de routine

Un résultat non conforme doit faire l'objet d'une vérification technique suivie de nouveaux contrôles. En cas de résultats toujours non conformes, une analyse des causes devra être effectuée, suivie des actions correctives qui en découlent et d'une requalification de la zone.

En fonction de l'étude de risque la surveillance peut être renforcée en respectant les mêmes conditions de prélèvements et d'analyse (appareil, volume prélevé, milieu, incubation...).

Remarque : Attention seuls les compteurs répondant à la norme ISO 21501-4 (2007) permettent d'effectuer des prélèvements conformes aux normes NF EN ISO 14644-1 et 2 (2016). Les autres ne permettent en aucun cas de valider une classe ISO et les résultats sont rendus « bruts » (valeurs obtenues par points contrôlés) ; ils peuvent toutefois être utiles pour détecter une dérive de ces valeurs brutes par rapport à un tableau de bord préalablement établi avec les mesures antérieurs de la zone contrôlée.

Rappel : Pour les qualifications, les volumes élémentaires doivent être respectés et le plan d'échantillonnage doit prévoir des points de contrôle dans toute la salle (annexe 3).

Tableau 25 : Tableau récapitulatif des critères particuliers et microbiologiques de l'air dans les zones à environnement maîtrisé

Zones		Classe ISO		CP _{0.5}	Classe bactériologique**		Référentiels
		Au repos	En activité		Au repos	En activité	
Salles d'opération, chambres de greffés, neutopéniques...		6 et 7	ND	10	≤ 10	ND	NF S90-351 (2013)
		5	ND	5	≤ 1	ND	
Locaux ISO 8 dont chambres de réanimation		8	ND	20	≤ 100	ND	
Stérilisation	Conditionnement	8*	ND	20	≤ 100	≤ 200 Moissures : < 1UFC/m ³	BPPH ⁽¹⁰⁾ AFS ⁽¹¹⁾ NF S90-351 (2013)
	Sortie stock stérile (si ZAC)		ND				
	Stockage stérile (si ZAC)		ND				
Pharmacie	Classe A	4,8	4,8	5	ND	< 1	NF S90-351 (2013), Bonnes pratiques de préparation ⁽¹³⁾ ,
	Classe B	5	5	5	ND	≤ 10	
	Classe C	7	7	10	ND	≤ 100	
	Classe D	8	ND	20	ND	≤ 200	
Thérapie cellulaire, banque de tissus	Classe A	4,8	4,8	15 à 20	ND	≤ 1	Présence de moissures = NC Décision du 27 octobre 2010 ⁽¹²⁾
	Classe B	5	5		ND	≤ 10	
	Classe C	7	7		ND	≤ 100	
	Classe D	8	ND		ND	≤ 200	

ND = Non déterminé ; NC = non conforme

* particules ≥ à 0,5, 1 et 5 µm

** ces résultats ne sont acceptables qu'en l'absence de MO indicateurs potentiellement pathogènes

Tableau 26 : Tableau récapitulatif des paramètres à contrôler lors des requalifications dans les zones à environnement maîtrisé

Zones		Contrôles	Comptage particulaire (CP)	Cinétique d'élimination des particules 0.5 µm (CPD)	Aérobio Contamination (AB)	Débit / vitesse air (D/VA)	Pression différentielle (PD)	Taux de renouvellement d'air (TRA)	Intégrité des filtres absolus (IFA)	Fréquence	Référentiels
Stérilisation	Conditionnement		+	*	+	+	+	+	+	Annuelle ⁶⁷	NF S90-351 (2013) NF EN ISO 14644-1 et 2 (2016) AFS ⁽¹¹⁾
	Sortie stock stérile (si ZAC)		+	+	+	+	+	+	+	Annuelle	NF S90-351 (2013) NF EN ISO 14644-1 et 2 (2016) AFS ⁽¹¹⁾
	Stockage stérile (si ZAC)		+	+	+	+	+	+	+	Annuelle	NF S90-351 (2013) NF EN ISO 14644-1 et 2 (2016) AFS ⁽¹¹⁾
Locaux ISO 8 dont chambres de réanimation			+		+	+	+	+		Annuelle	NF S90-351 (2013) NF EN ISO 14644-1 et 2 (2016)
Salles opératoires, chambres de greffés, neutopéniques...			+		+	+	+	+		Annuelle	NF S90-351 (2013) NF EN ISO 14644-1 et 2 (2016)
Pharmacie	Classe A		+ *	+/- ⁶⁸						A définir par les utilisateurs en fonction des caractéristiques de la ZEM	BPF ⁽¹⁶⁾ BPPH ⁽¹⁰⁾ BPP ⁽¹³⁾
	Classe B										
	Classe C				+	+	+		+		
	Classe D										
Thérapie cellulaire, banque de tissus	Classes A et B	Au repos	+	+/-	-	+	+	+	+	Semestrielle sauf CDP : Annuelle : IFA : Tous les 2 ans ou lors du changement des filtres :	Décision du 27 octobre 2010 ⁽¹²⁾
	Classes C et D	Au repos	+	+/- **	+	+	+/-	+	+	Annuelle IFA : Tous les 2 ans ou lors du changement des filtres :	Décision du 27 octobre 2010 ⁽¹²⁾

* Particules ≥ à 0.5, 1 et 5 µm.

** En fonction de l'analyse de risque.

CP : comptage particulaire, CDP = cinétique d'élimination des particules, AB : aérobiocontamination, D/VA = débit/vitesse air, PD = pression différentielle, TRA = taux de renouvellement d'air, IFA = intégrité des filtres absolus.

Tableau 1 : Liens hypertextes par thème

GENERALITES (communes aux 4 thèmes)	Chapitre 1 Stratégie (p 17)	Chapitre 3 Prélèvement (p 41)	Chapitre 4 Analyse (p 720)	Chapitre 5 Interprétation (p 84)
AIR	Stratégie (p 21)	Prélèvement CP (p 45) Aerobio (p 50)	Analyse (p 73)	Interprétation (p 86)
EAU	Stratégie (p 25)	Prélèvement (p 54)	Analyse (p 75)	Interprétation (p 90)
SURFACES	Stratégie (p 28)	Prélèvement (p 60)	Analyse (p 78)	Interprétation (p 92)
ENDOSCOPES	Stratégie (p 31)	Prélèvement (p 64)	Analyse (p 81)	Interprétation (p 95)

⁶⁷ Une fois par an tous les paramètres devront être vérifiés et validés par une société spécialisée.

⁶⁸ Cinétique d'élimination des particules particulaire conseillée tous les 2 ans par les normes NF ISO 14644-1 et 2 et NF S90-351.

Eau : Interprétation des résultats

L'interprétation des résultats de la surveillance microbiologique de l'eau nécessite *a minima* la collaboration entre les services techniques et l'EOH pour prendre en compte la configuration du réseau et appliquer au mieux les mesures correctives en cas de non-conformité des résultats.

Exigences de qualité microbiologiques pour la potabilité de l'eau

L'eau d'entrée doit être conforme aux exigences de potabilité (limites + références de qualité) définies par les articles R.1321-1 à R.1321-5, du code de la santé publique, relatifs aux eaux destinées à la consommation humaine à l'exclusion des eaux minérales naturelles.

Les eaux destinées à la consommation humaine (eau à usage alimentaire, eau des fontaines réfrigérantes, glace alimentaire) doivent (art. R 1321-2) :

- ne pas contenir un nombre ou une concentration de micro-organismes, de parasites ou de toutes autres substances constituant un danger potentiel pour la santé des personnes ;
- être conformes aux **limites de qualité**, portant sur des paramètres microbiologiques et chimiques, définies par arrêté du ministre chargé de la santé ;
- satisfaire aux **références de qualité** portant sur des paramètres indicateurs de qualité, témoins du fonctionnement des installations de production et de distribution.

L'arrêté du 11 janvier 2007 relatif aux limites et références de qualité des eaux brutes et des eaux destinées à la consommation humaine mentionnées aux articles R.1321-2, R.321-3, R.321-7 et R.321-38 du code de la santé publique précise les **limites** et les **références de qualité microbiologiques** des eaux destinées à la consommation humaine (tableaux 27 et 28).

Tableau 27 : Limites de qualité des eaux destinées à la consommation humaine.

Paramètres microbiologiques (arrêté du 11 janvier 2007)

Paramètres à contrôler	Limites de qualité	Unité
<i>Escherichia coli</i>	0	/ 100 mL
Enterocoques intestinaux	0	/ 100 mL

Tableau 28 : Références de qualité des eaux destinées à la consommation humaine. Paramètres microbiologiques (arrêté du 11 janvier 2007)

Paramètres à contrôler	Références de qualité	Unité
Spoires de micro-organismes anaérobies sulfito-réducteurs (pour les eaux d'origine superficielle ou influencées par une eau d'origine superficielle) *	0	/ 100 mL
Bactéries coliformes	0	/ 100 mL
Dénombrement des micro-organismes revivifiables à 22°C et 36°C	Variation dans un rapport de 10 par rapport à la valeur habituelle	

* Ce paramètre doit être mesuré lorsque l'eau est d'origine superficielle ou influencée par une eau d'origine superficielle. En cas de non-respect de cette valeur, une enquête doit être menée sur la distribution d'eau pour s'assurer qu'il n'y a aucun danger potentiel pour la santé humaine résultant de la présence de micro-organismes pathogènes, par exemple *Cryptosporidium*

Critères microbiologiques pour les eaux utilisées dans un ES

L'eau d'entrée doit répondre aux exigences de qualité de l'eau potable. Les différents paramètres microbiologiques applicables aux autres eaux utilisées en ES sont rapportés dans le tableau 29.

Les résultats anormaux (variation dans un rapport de 10 par rapport au niveau cible pour la flore mésophile aérobie revivifiable) et/ou la présence d'un coliforme, d'un *Pseudomonas aeruginosa* ou d'un autre micro-organisme « marqueur ⁶⁹ » doivent déclencher la vérification des conditions de prélèvement et d'analyse, le renouvellement des contrôles. En cas de confirmation de ces résultats anormaux, il faut réaliser un bilan d'extension géographique qui aidera à l'analyse des causes et à la mise en place des mesures correctives.

⁶⁹ Micro-organisme dont la présence dans l'écosystème hydrique de l'ES témoigne d'un dysfonctionnement (*Aeromonas*, ...)

Tableau 29 : Principaux paramètres microbiologiques des eaux utilisées dans un ES					
Typologie		Paramètres	Valeurs cibles	Remarques	Référentiels
Eau pour soin standard		FAR à 22°C	≤ 100 UFC/mL	Tolérance d'une variation dans un rapport de 10 par rapport au niveau cible	Guide ministère 2002 ⁽¹⁾ Guide de l'eau ⁽¹⁴⁾
		FAR à 36°C	≤ 10 UFC/mL		
		Coliformes totaux	< 1 UFC/100 mL	En présence de coliformes totaux, il est nécessaire de rechercher <i>E. coli</i> .	
		<i>P. aeruginosa</i>	< 1 UFC/100 mL	Un autre germe marqueur peut être choisi en fonction de l'écosystème du réseau d'eau interne à l'ETS	
Eau chaude sanitaire		<i>Legionella pneumophila</i>	≤ 1000 UFC/L	Tous les points d'usage à risque	Arrêté du 1er février 2010
			< seuil de détection et <i>L. pneumophila</i> non détectée	Points d'usage à risque accessibles à des patients identifiés par le CLIN ou toute organisation chargée des mêmes attributions comme particulièrement vulnérables au risque de légionellose	
Piscines de rééducation		FAR à 36°C	< 100 UFC/mL	Tolérance d'une variation dans un rapport de 10 par rapport à la valeur habituelle	Guide ministère 2002 ⁽¹⁾ Guide de l'eau ⁽¹⁴⁾ Anses ⁽¹⁷⁾ ⁽¹⁸⁾
		<i>E. coli</i>	< 1 UFC/100 mL	Exigence plus sévère que Article D1332-2 du code de la santé publique : < 10 UFC/100mL	
		<i>S. aureus</i>	< 1 UFC/100 mL	-	
		<i>P. aeruginosa</i>	< 1 UFC/100 mL	Un autre germe marqueur peut être choisi en fonction de l'écosystème du réseau d'eau interne à l'ES	
Bains à remous, douches à jet		FAR à 36°C	< 100 UFC/mL	Tolérance d'une variation dans un rapport de 10 par rapport à la valeur habituelle	Circulaire DGS/EA4 n° 2008-65 du 22 février 2008 Décret n° 2008-990 du 18 septembre 2008
		<i>E. coli</i>	< 1 UFC/100 mL	Exigence plus sévère que Article D1332-2 du code de la santé publique (< 10 UFC/100mL)	
		<i>S. aureus</i>	< 1 UFC/100 mL	-	
		<i>P. aeruginosa</i>	< 1 UFC/100 mL	Un autre germe marqueur peut être choisi en fonction de l'écosystème du réseau d'eau interne à l'ES	
		<i>Legionella pneumophila</i>	< seuil de détection et <i>L. pneumophila</i> non détectée	-	
Eau bactériologiquement maîtrisée		FAR à 22°C	≤ 1 UFC/100 mL	<i>Si l'eau bactériologiquement maîtrisée est obtenue à l'aide d'un filtre terminal à usage unique, validé par le fabricant : le contrôle de l'eau n'est pas nécessaire à condition de valider l'utilisation des filtres (mise en place, durée d'utilisation...) et de ne rajouter aucune connectique non stérile en aval du filtre (audit de pratiques)</i>	Guide de l'eau ⁽¹⁴⁾
		<i>P. aeruginosa</i>	< 1 UFC/100 mL		
Dialyse conventionnelle	Départ boucle	FAR à 22°C	< 100 UFC/mL	En pratique, les centres de dialyse exigent une qualité supérieure à la pharmacopée ou à la norme : < 10 UFC/100 mL.	Pharmacopée européenne Circulaire DGS/DH/AFSSAPS n°2000-37 du 20 juin 2000 Norme NF S93-315 (2008)
	Dialysat (en amont de l'hémodialyseur)		< 100 UFC/mL		
Hémofiltration et hémodiafiltration en ligne	Départ de boucle d'alimentation des générateurs	FAR à 22°C	< 100 UFC/L	En cas de culture positive supérieure au seuil fixé, l'identification des germes est indispensable	Circulaire DHOS/AFSSAPS/DGS n°2007-52 du 30 janvier 2007 Norme NF S93-315 (2008)
	Dialysat ultra pur		< 10 UFC/100 mL		
	Liquide de substitution		0 UFC/500 mL		

Tableau 1 : Liens hypertextes par thème				
GENERALITES (communes aux 4 thèmes)	Chapitre 1 Stratégie (p 17)	Chapitre 3 Prélèvement (p 41)	Chapitre 4 Analyse (p 720)	Chapitre 5 Interprétation (p 84)
AIR	Stratégie (p 21)	Prélèvement CP (p 45) Aerobio (p 50)	Analyse (p 73)	Interprétation (p 86)
EAU	Stratégie (p 25)	Prélèvement (p 54)	Analyse (p 75)	Interprétation (p 90)
SURFACES	Stratégie (p 28)	Prélèvement (p 60)	Analyse (p 78)	Interprétation (p 92)
ENDOSCOPES	Stratégie (p 31)	Prélèvement (p 64)	Analyse (p 81)	Interprétation (p 95)

Surfaces : Interprétation des résultats

Cas général

Il n'y a pas de textes réglementaires exprimant des critères de conformité pour la surveillance microbiologique des surfaces à l'exception des Bonnes Pratiques de Thérapie cellulaire ⁽¹²⁾ et des BPP ⁽¹⁰⁾.

Les résultats d'un contrôle de surface doivent être considérés dans leur globalité et, plus important que les valeurs absolues de chaque point, c'est l'évolution des résultats dans le temps qui permet d'avoir un historique de qualité microbiologique des surfaces **à condition que la méthodologie de prélèvement soit la même et soit adaptée à la surface prélevée**. Des résultats isolés, hors recherche ciblée (épidémie), sont inexploitable.

Il est classique de déterminer un niveau cible différent hors ou en présence humaine (tableaux 30 et 31). Ces valeurs prédéfinies (CCTP et/ou les protocoles de l'ES) sont généralement données en unité formant colonie pour une superficie en cm² (exemple : UFC/25 cm² pour les boîtes contacts).

La méthode de prélèvement est indissociable de l'interprétation des résultats, ils sont rendus :

- pour les points ciblés en :
 - qualitatif : présence / absence avec, si besoin, identification (flore monomorphe, germes indicateurs⁷⁰ : *S. aureus*, entérobactéries, entérocoques...),
 - quantitatif non normatif : conditions de prélèvements « simplifiée » (ex : poids de 200 g, pression manuelle sur une boîte contact... écouvillons),
 - quantitatif normatif : conditions de prélèvements normalisées, protocolées et reproductibles,
- pour les points aléatoires en :
 - pourcentage de prélèvements conformes et non conformes avec identification si nécessaire (flore monomorphe, germes indicateurs : *S. aureus*, entérobactéries, entérocoque...).

Tableau 30 : Valeurs cibles en UFC/25 cm² pour les prélèvements de surfaces par empreintes gélosées après bionettoyage

Classe de risque ou classe de propreté particulière	Risque 4 ou ISO 5	Risque 3 ou ISO 7	Risque 2 ou ISO 8	Risque 1
Valeurs cibles hors présence humaine/25 cm²				
FAR	≤ 1	≤ 5	≤ 25	*
<i>Aspergillus sp.</i>	< 1	< 1	< 1	
Micro-organismes indicateurs	< 1	< 1	< 1	

* à déterminer par ES en fonction de l'objectif.

Tableau 31 : Valeurs cibles en UFC/25 cm² pour les prélèvements de surfaces des ZEM de la pharmacie, la thérapie cellulaire et la stérilisation « en activité » suivant les Bonnes Pratiques ^{(10)(11) (12) (13) (16)}

Classe de risque des Bonnes Pratiques	Classe A	Classe B	Classe C	Classe D-
Valeurs cibles en activité/25 cm²				
FAR	≤ 1	≤ 5	≤ 25	≤ 50
« moisissures »	< 1	< 1	< 1	< 1
Micro-organismes indicateurs	< 1	< 1	< 1	< 1

L'interprétation des résultats doit prendre en compte le nombre de résultats classés non conformes et l'antériorité pour élaborer une conduite à tenir. Par exemple, l'AFS ⁽¹¹⁾ retient pour la stérilisation une interprétation par zone basée sur le nombre de colonie par boîte et le nombre de points « non satisfaisant » (tableau 32) :

⁷⁰ Germes indicateurs de contamination humaine résiduelle.

Tableau 32 : Exemple d'interprétation des résultats des prélèvements de surface à la stérilisation d'après l'AFS ⁽¹¹⁾ en UFC/25cm ² (UFC/boite)			
Zone	Lavage	Conditionnement et sortie stérile	
Cible : ' X'	Hors présence humaine	Hors présence humaine	En présence humaine
Satisfaisant	< 5	< 5	< 15
Acceptable	5 < X < 15	5 < X < 15	15 < X < 30
Si X > acceptable	X > 15	X > 15	X > 30
1 point NA	Signaler	Signaler	Alerte : revoir les comportements ou le nombre d'agents présents...
2 à 4 points NA	Revoir nettoyage	Revoir nettoyage	
≥ 5 points NA	Inacceptable	Inacceptable	
Si présence de <i>Staphylococcus</i> , Entérobactéries, <i>Pseudomonas</i> , <i>Aspergillus</i> : revoir procédure de nettoyage - contrôle			

NA = non acceptable

Spécificités

Contrôles microbiologiques du linge

Les contrôles de linge à la blanchisserie s'inscrivent dans une démarche qualité. La norme NF EN 14065 (2003) : Textiles « Textiles traités en blanchisserie - Système de maîtrise de la biocontamination » définit la qualité du linge propre.

Elle décrit un système de management permettant d'assurer la qualité microbiologique des textiles traités en blanchisserie utilisés dans des secteurs spécifiquement définis dans lesquels la maîtrise de la biocontamination est nécessaire. Le document décrit un système d'analyse du risque et de maîtrise de la biocontamination (RABC) en blanchisserie pour permettre d'assurer continuellement la qualité microbiologique des textiles traités.

Elle fournit les principes de base pour juger de la qualité hygiénique du linge.

Les prélèvements sont réalisés soit à l'aide de gélose contact soit par macération d'un échantillon de linge.

Attention : La technique de prélèvement par boîte contact sur le linge a un rendement d'extraction très faible et les résultats sont aléatoires alors que la deuxième technique préconisée dans la norme (technique par macération) sur les mêmes échantillons de linge multiplie les résultats par 2 ou 3 log !⁽²³⁾

Contrôles en « cuisine » (restauration collective à caractère social)

La démarche HACCP, mise en œuvre dans les établissements de santé depuis l'arrêté de 1997 fixant les conditions d'hygiène applicables dans les établissements de restauration collective à caractère social, implique d'analyser et de maîtriser les risques. Dans ce cadre, les prélèvements de surfaces intégrés dans un plan de nettoyage sont un complément au contrôle visuel car ils apportent des éléments de preuve pour contrôler l'efficacité microbiologique de la désinfection. Le plus souvent en plus de la FAR, ces contrôles incluent la recherche et le dénombrement de germes témoins d'une contamination fécale (coliformes totaux) ou d'une mauvaise hygiène générale (coliformes à 30°C, ou *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus* pouvant être à l'origine de TIAC). L'emploi de milieux spécifiques (ex VRBL) peut faciliter cette recherche.

Recherche ciblée de champignons (« moisissures »)

- Indications :
 - dans des secteurs à haut risque d'infection fongique (ex : onco-hématologie, transplantés...) et ayant un système de maîtrise de la contamination microbiologique de l'air (ZEM ou unité mobile de décontamination de l'air) ;
 - dans le cadre de travaux dans un secteur à empoussièrisme maîtrisé ou un secteur adjacent.

- Particularités pour la recherche de champignons :
 - milieux spécifiques (ex : Malt, Sabouraud...) ;
 - incubation :
 - * *A. fumigatus* se développe à 42°C en 48 heures ; il se développe aussi très bien à 36°C ou à 30°C, températures généralement disponibles dans un laboratoire mais attention à ne pas contaminer l'étuve (conidies très « volatiles ») ;
 - * pour les autres champignons filamenteux l'incubation de 22 ± 2°C (ou, à défaut, à température ambiante) pendant 5 à 7 jours ;
 - **Attention :** La manipulation des boîtes peut entraîner une dispersion des conidies créant un ensemencement secondaire de la boîte qui fausse les dénombrements ultérieurs : il est donc impératif de ne faire qu'une lecture des boîtes si elles sont positives.
- Interprétation : pour *Aspergillus sp.*, le niveau cible est < 1 UFC/25 cm² et les niveaux alerte et action sont confondus : 1 UFC/25 cm²⁽¹⁾.

Tableau 1 : Liens hypertextes par thème				
GENERALITES (communes aux 4 thèmes)	Chapitre 1 Stratégie (p 17)	Chapitre 3 Prélèvement (p 41)	Chapitre 4 Analyse (p 720)	Chapitre 5 Interprétation (p 84)
AIR	Stratégie (p 21)	Prélèvement CP (p 45) Aerobio (p 50)	Analyse (p 73)	Interprétation (p 86)
EAU	Stratégie (p 25)	Prélèvement (p 54)	Analyse (p 75)	Interprétation (p 90)
SURFACES	Stratégie (p 28)	Prélèvement (p 60)	Analyse (p 78)	Interprétation (p 92)
ENDOSCOPES	Stratégie (p 31)	Prélèvement (p 64)	Analyse (p 81)	Interprétation (p 95)

Endoscopie : Interprétation des résultats

Attention : Une instruction est en cours de rédaction et sera publiée en 2016. C'est un document unique qui concerne le traitement des endoscopes souples thermosensibles. Dès sa parution, ce texte sera la référence réglementaire à appliquer.

Endoscopes

Les critères d'interprétation sont à 3 niveaux (tableau 33) qui déterminent une conduite à tenir :

- Niveau cible :
 - vise à assurer et à maintenir des conditions normales de fonctionnement et de sécurité dans le contexte d'un procédé maîtrisé,
 - niveau à respecter lors de la validation d'une procédure de traitement des endoscopes.
- Niveau d'alerte :
 - permet une première alerte en cas de dérive par rapport aux conditions normales,
 - correspond à des valeurs encore acceptables sur le plan quantitatif,
 - nécessite :
 - * des mesures correctives sans suspension d'utilisation de l'endoscope,
 - * un nouveau contrôle de l'endoscope pour vérifier l'efficacité des mesures correctives.
- Niveau d'action :
 - témoigne d'un risque infectieux potentiel pour les patients ou d'un dysfonctionnement important ;
 - implique :
 - * l'arrêt d'utilisation de l'endoscope,
 - * l'analyse des causes du dysfonctionnement,
 - * la mise en œuvre d'actions correctives,
 - * de nouveau(x) contrôle(s) de l'endoscope pour vérifier l'efficacité des mesures correctives avant sa remise en service.

Tableau 33 : Aide à l'interprétation des résultats pour la surveillance microbiologique du processus de traitement des endoscopes⁽³⁾

Niveau de désinfection	Niveau cible	Niveau d'alerte	Niveau d'action
Désinfection de haut niveau rinçage à l'eau stérile	FAR < 1 UFC	-	FAR ≥ 1 UFC
Désinfection de niveau intermédiaire et rinçage à l'eau bactériologiquement maîtrisée	FAR < 5 UFC ET absence de MO indicateurs	FAR : 5 -25 UFC ET absence de MO indicateurs	FAR > 25 UFC OU présence de MO indicateurs
Désinfection de niveau intermédiaire et rinçage à l'eau pour soins standards	FAR < 25 UFC ET absence de MO indicateurs	FAR : 25 -100 UFC ET absence de MO indicateurs	FAR > 100 UFC OU présence de MO indicateurs

Exemple des principaux micro-organismes indicateurs de processus : *S. aureus*, entérobactéries, *P. aeruginosa*

Remarques :

Ce tableau peut être adapté au sein de l'ES en fonction de l'analyse de risque faite par l'EOH en fonction :

- des micro-organismes indicateurs : *Acinetobacter*, *Aspergillus* (mauvais stockage...), (*Pseudomonas sp.*, *Acinetobacter*, *Stenotrophomonas* (mauvais séchage), *S. aureus*, entérobactéries, *P. aeruginosa*... (risque pour le patient),
- du niveau cible : notamment pour adapter celui requis pour le haut niveau de désinfection en fonction des conditions du prélèvement quand il est réalisé hors environnement maîtrisé...
- de la destination de l'endoscope (voie haute, voie basse...)

Il est recommandé pour l'interprétation des résultats d'avoir à disposition un résultat récent de contrôle microbiologique de l'eau de rinçage ou de réaliser un contrôle de cette eau en parallèle.

Eau en endoscopie

L'interprétation des analyses dépend de la qualité de l'eau utilisée (tableau 29).

Pour les LDE, la qualité d'eau demandée pour l'eau d'alimentation est celle de l'eau pour soins standards et celle de l'eau bactériologiquement maîtrisée pour l'eau après le système de traitement.

ESET

- Les contrôles des endoscopes stockés dans une ESET doivent présenter des résultats conformes au niveau cible (tableau 33).
L'obtention d'un résultat microbiologique non conforme pour un endoscope ne permet pas d'utiliser l'ESET pour cette famille d'endoscope. Ce résultat doit par ailleurs être considéré comme une anomalie qui doit déclencher un processus de recherche des causes de la non-conformité sur l'ensemble de la chaîne de traitement des endoscopes ou sur une éventuelle défaillance ou un mésusage de l'ESET.
- Les surfaces : Les niveaux de contamination mis en évidence doivent être inférieurs à 25 UFC/25 cm² et exempts de micro-organismes indicateurs.
- L'air

Tableau 34 : Résultats des contrôles de l'air dans les ESET en fonction des normes				
Norme	NF S 98-030 (2012)		NF EN 16442 (2015)	
Prélèvement par	Impaction	Sédimentation	Impaction	Sédimentation
Résultats		en UFC par boîte	en UFC/m ³	en UFC/boîte
Interprétation (valeur cible)	Classe revendiquée par le fabricant	<25 UFC par boîte et absence de MO indicateurs	<100 UFC/m ³ et absence de MO indicateurs	Somme des 4 boîtes <50 UFC et absence de MO indicateurs

Les qualifications des LDE et des ESET

- Se reporter à l'annexe 5.

Tableau 1 : Liens hypertextes par thème				
GENERALITES (communes aux 4 thèmes)	Chapitre 1 Stratégie (p 17)	Chapitre 3 Prélèvement (p 41)	Chapitre 4 Analyse (p 720)	Chapitre 5 Interprétation (p 84)
AIR	Stratégie (p 21)	Prélèvement CP (p 45) Aerobio (p 50)	Analyse (p 73)	Interprétation (p 86)
EAU	Stratégie (p 25)	Prélèvement (p 54)	Analyse (p 75)	Interprétation (p 90)
SURFACES	Stratégie (p 28)	Prélèvement (p 60)	Analyse (p 78)	Interprétation (p 92)
ENDOSCOPES	Stratégie (p 31)	Prélèvement (p 64)	Analyse (p 81)	Interprétation (p 95)

Fiches Pratiques

Fiche pratique 1 : Contrôle microbiologique de l'eau chaude sanitaire à la recherche de <i>Legionella</i> et <i>Legionella pneumophila</i> (réseau d'eau chaude sanitaire de l'ES)	
Objectif	- Détection et quantification de <i>Legionella</i> dont <i>Legionella pneumophila</i>
Stratégie	- Recherches telles que prévues dans les textes réglementaires (arrêté de 2010, circulaires 2002 et 2010) - Recherches spécifiques dans le cadre d'une investigation
Cahier des charges : spécificités choix du laboratoire	Quand ils sont réglementaires, les prélèvements d'eau et analyses de légionelles sont réalisés par un laboratoire accrédité pour le paramètre légionelles par le Comité français d'accréditation ou tout autre organisme d'accréditation équivalent européen signataire de l'accord multilatéral pris dans le cadre de la coordination européenne des organismes d'accréditation.
Prélèvements	- Plan d'échantillonnage ⇒ points critiques dont les points réglementaires (fond de ballon ou, à défaut, départ de circuit, retour de boucle, point(s) d'usage le(s) plus éloigné(s) de la production d'eau chaude sanitaire, points représentatifs, points situés dans des services accueillant des patients identifiés par le CLIN (ou toute organisation chargée des mêmes attributions comme particulièrement vulnérables au risque de légionellose). Attention : si désinfection du circuit, la durée écoulée entre la désinfection et le prélèvement est un paramètre important pour l'interprétation des résultats et doit également figurer dans le rapport d'essai : « <i>afin que les résultats d'analyses soient représentatifs de l'efficacité des opérations de désinfection curative, les prélèvements d'eau pour analyse de « recontrôle » des légionelles doivent être réalisés au moins 48 heures après la mise en œuvre de la désinfection pour vérifier son efficacité, et après un délai de 2 à 8 semaines pour s'assurer de l'effet de l'ensemble des mesures mises en place (équilibrage des réseaux, suppression des bras morts, etc.) et de l'absence de recolonisation des réseaux</i> » ; - Personnel formé ou mieux habilité ; - Fiche de prélèvement ; - Fréquence minimale : annuelle ; - Volume minimal par point prélevé : 500 mL ; - Conditions de prélèvements : ▪ flacons stériles + neutralisant si besoin⁷¹, ▪ noter la température de l'eau⁷², et la concentration de désinfectant si présent ▪ point d'usage : * contrôle de l'exposition : 1^{er} jet sans démontage des accessoires (mousseur, pomme de douche...) sans désinfection et sans purge, * contrôle de l'eau dans le circuit interne (amont point d'usage): après purge de 2 à 3 minutes de façon à recueillir l'eau de l'amont. - Conditions de transport et délai d'acheminement : norme NF T90-431 (2014) ▪ lesensemencements doivent être réalisés le plus rapidement possible et au maximum le lendemain du prélèvement. Le transport et la conservation de l'échantillon sont réalisés à température ambiante de préférence en enceinte isotherme non réfrigérée, ▪ il est recommandé de séparer les échantillons chauds des échantillons froids.
Analyses	- Norme NF T90-431 (2014) - Ensemencement sur milieux sélectifs GVPC - Incubation à $36 \pm 2^{\circ}\text{C}$ pendant 8 à 11 jours - Dénombrement des colonies confirmées
Résultats	- Délai résultats ≥ 8 à 11 jours ; résultats provisoires possibles sous conditions (NF T90-431 (2014)) - L'ensemble des résultats doit être exprimé, en gardant deux chiffres significatifs, sous la forme : ▪ <i>Legionella</i> UFC/litre, ▪ dont <i>Legionella pneumophila</i> UFC/litre, - Conservation des souches : 1 année (l'arrêté de 2010 précise : « <i>lorsque les seuils mentionnés à l'article 4 sont dépassés, le responsable des installations demande au laboratoire chargé de l'analyse que lesensemencements correspondant à ces résultats soient conservés pendant trois mois par le laboratoire</i> »).
Interprétation	- Valeurs cibles⁷³ : < 1 000 UFC/L de <i>L. pneumophila</i> et < seuil de détection de <i>L. pneumophila</i> au niveau de tous les points d'usage à risque accessibles à des patients identifiés par le CLIN ou toute organisation chargée des mêmes attributions comme particulièrement vulnérables au risque de légionellose. - Valeurs alertes et actions : ▪ $\geq 1\,000$ UFC/L de <i>L. pneumophila</i> au niveau de tous les points d'usage ou de production, ▪ $\geq$ seuil de détection de <i>L. pneumophila</i> au niveau de tous les points d'usage à risque accessibles à des patients identifiés par le comité de lutte contre les infections nosocomiales ou toute organisation chargée des mêmes attributions comme particulièrement vulnérables au risque de légionellose.⁷⁴ ⇒ Ces valeurs doivent donner lieu à une analyse des causes de la contamination.

⁷¹ Si les eaux prélevées sont chlorées, bromées ou ozonées, le récipient collecteur stérile doit contenir du thiosulfate de sodium en quantité suffisante pour neutraliser les oxydants. D'autres produits biocides (bactéricides ou bactériostatiques) sont parfois utilisés et il n'est pas toujours possible de les neutraliser : leur présence, qui peut conduire à une sous-estimation voire une inhibition de la culture des *Legionella*, doit être déclarée et figurer dans le rapport d'essai si elle est connue.

⁷² La surveillance pour les établissements de santé repose aussi sur des mesures de la température de l'eau dans chacun des réseaux d'eau chaude sanitaire, aux fréquences de contrôle minimales précisées en annexe 1 de l'arrêté du 1er février 2010.

⁷³ Arrêté du 1er février 2010 relatif à la surveillance des légionelles dans les installations de production, de stockage et de distribution d'eau chaude sanitaire.

⁷⁴ Le risque lié aux légionelles : guide d'investigation et d'aide à la gestion. ⁽²³⁾

Fiche pratique 2 : Contrôle microbiologique de l'eau de dialyse (de la production à l'utilisation)	
Objectif	- Assurer la qualité microbiologique de l'eau utilisée en dialyse : eau à usage médical utilisée pour la dilution des concentrés pour hémodialyse et obtenue à partir de l'eau potable (eau du réseau destinée à la consommation humaine)
Stratégie	- Les contrôles sont réglementaires (Circulaire DGS/DH/AFSSAPS n° 2000-337 du 20 juin 2000, circulaire DHOS/AFSSAPS/DGS n°2007-52 du 30 janvier 2007) et normatifs (pharmacopée européenne, norme NF S90-315 (2008)) - La qualité de l'eau est sous la responsabilité du pharmacien de l'établissement jusqu'au générateur puis sous responsabilité médicale - Le respect des exigences bactériologiques des fluides pour hémodialyse doit être : ▪ validé par l'utilisateur lors de la mise en service du générateur ▪ contrôlé ensuite par un programme de surveillance adapté (réglementation, nombre de séances...) ▪ associé à la recherche d'endotoxines
Cahier des charges : spécificités choix du laboratoire	- Les analyses doivent être réalisées suivant les méthodologies préconisées par les textes en vigueur (cf stratégie) - Contrôle qualité externe souhaitable
Prélèvements	- Formé, ou mieux habilité - Configuration opérationnelle (sans branchement du patient), conditions d'asepsie, flacons stériles (apyrogène pour endotoxine) - Fréquence minimale : ▪ départ de boucle d'alimentation des générateurs de dialyse (eau pour dilution des concentrés de dialyse) : en fonction du nombre des séances annuelles ▪ circuit du système de production d'eau pour dilution des concentrés d'hémodialyse : annuelle ou plus en fonction de l'analyse de risque ▪ dialysat des générateurs d'hémodialyse conventionnelle : annuelle ou plus en fonction de l'analyse de risque ▪ dialysat ultrapur et solution de substitution pour l'hémodifiltration et l'hémodiafiltration : trimestrielle après validation (tableau 15, p 61) - Volume minimal par point prélevé : ▪ circuit du système de production d'eau pour dilution des concentrés d'hémodialyse : 100 mL ▪ départ de boucle d'alimentation des générateurs : * hémodialyse conventionnelle: 100 mL * hémodifiltration et hémodiafiltration en ligne : 1 000 mL ▪ dialysat : 100 mL de dialysat affluent (en amont de l'hémodialyseur) ▪ dialysat ultra pur (en amont de l'hémodialyseur) : 100 mL ▪ solution de substitution (après la seconde ultrafiltration du dialysat) : 500 mL - Fiche de prélèvement - Conditions de transport et délai d'acheminement ▪ norme NF S93-315 (2008) : « il est recommandé de définir avec le laboratoire les conditions d'acheminement des échantillons (délais, température) » ▪ si la durée du transport est supérieure à 8 heures, réfrigérer les échantillons (5±3°C) pendant le transport (préférer les blocs réfrigérants qui ne fondant pas limitent le risque de « mouillage » des étiquettes ou inscriptions sur les flacons...)
Analyses	- Technique par filtration : ▪ filtration sur membrane (nitrate de cellulose, 0,45 µm) ▪ milieux pauvres en nutriments type TGEA ou R2A ▪ incubation à 20-22°C pendant au minimum 7 jours
Résultats	- Délai résultats ≥ 7 jours - Résultats : ▪ quantitatif : en UFC / volume ▪ qualitatif : identification des MO si numération supérieure à la valeur cible
Interprétation	Niveaux cibles (FAR à 22°C) - Circuit du système de production d'eau pour dilution des concentrés d'hémodialyse < 100 UFC/mL (pharmacopée) ; - Départ de boucle d'alimentation des générateurs : ▪ hémodialyse conventionnelle * « pharmacopée » < 100 UFC/mL * « usuelle »⁷⁵ < 10 UFC/100 mL ▪ hémodifiltration et hémodiafiltration en ligne < 100 UFC/L - Dialysat ▪ Norme NF S93-315 (2008) < 100/mL ▪ « usuelle » < 10 UFC/100 mL - Dialysat ultra pur < 100 UFC/L - Solution de substitution (après la seconde ultrafiltration du dialysat) < 1 UFC dans 500 mL Niveaux cibles endotoxines : < 0,25 UI/mL sauf pour solution de substitution dont le niveau cible est : ≤ 0,05 UI/mL

UI : unités internationales

⁷⁵ En pratique, les centres de dialyse exigent une qualité supérieure à celle de la pharmacopée pour l'eau de dilution des concentrés d'hémodialyse (<10 UFC/100 mL à 22°C).

Fiche pratique 3 : Contrôles de l'environnement au bloc opératoire hors qualification (zones à environnement maîtrisé ISO 5 à ISO 7)	
Objectifs	- Rechercher des micro-organismes dans l'air, sur les surfaces et dans l'eau (quantifier et identifier si besoin). - Quantifier les particules en fonction de leur diamètre (classe particulaire) ;
Stratégie	Pour les contrôles (en routine) d'une salle opératoire au repos, le CLIN et/ou l'EOH de l'ES définiront la fréquence pour la surveillance de : ▪ l'air : comptage particulaire ± aérobiocontamination ▪ des surfaces, ▪ de l'eau.
Cahier des charges : spécificités choix du laboratoire	- Préciser qu'il s'agit d'un contrôle d'une salle opératoire au repos ; - Mentionner s'il s'agit d'une analyse particulaire (air, préciser la tailles des particules à prendre en compte) et/ou microbiologique (air, surfaces, eau) ; - Préciser le référentiel que devra utiliser le prestataire (ex : NF S90-351 ; NF EN ISO 14644-1 et 2 (2016), NF EN ISO 14698-1...) ; - Demander que soit mentionné dans le compte rendu : centrale de traitement d'air en marche ou non, heure du prélèvement, heure de la fin du dernier nettoyage de la salle, différentiel de pression salle-zones adjacentes ... ; - Préciser les caractéristiques du ou des appareils utilisés (certificat d'étalonnage en cours de validité...) ; - Indiquer les variables devant figurer dans le rapport : localisation des prélèvements, taille des particules, techniques et milieux de cultures utilisés...
Prélèvements	- Personnel formé ou mieux habilité - Plan d'échantillonnage ⇒ Les points à surveiller prioritairement sont préalablement définis par une analyse de risque et reportés sur le plan des locaux (norme NFS90-351, NF EN ISO 14644-1 et 2 (2016)) - Fiche de prélèvement - Fréquence minimale : à définir en fonction des objectifs et de l'analyse de risque (pour l'air : à planifier entre les qualifications) ; - Volume minimal par point prélevé : ▪ pour l'air : * aérobiocontamination : en général 1000 L pour les classes M1 et M10^{76 77} (bactéries et fongiques), et 200 ou 500 L pour les zones ≥ M100) * comptage particulaire : volume élémentaire calculé en fonction de la taille de la particule de référence (annexe 3) ▪ pour l'eau : se reporter au tableau 20 ; ▪ pour les surfaces : * la norme ISO 14698-1 préconise un prélèvement sur une superficie minimale de 20 cm², (la surface de l'empreinte effectuée avec une boîte contact est de 25 cm²), - Conditions de prélèvements : ▪ salle au repos après bionettoyage (temps minimum de 3 CP_{0,5} (ou au moins 1 heure si le CP_{0,5} n'est pas connu avec précision), - Conditions de transport et délai d'acheminement : ▪ comptage particulaire : sans objet ▪ aérobiocontamination, surfaces : géloses fermées, identifiées et acheminées dans les 12 heures au laboratoire à température ambiante (ne pas les réfrigérer), ▪ eau : sauf indication contraire dans les normes spécifiques et si la durée du transport est supérieure à 8 heures, réfrigérer les échantillons (5 ± 3°C) pendant le transport (préférer les blocs réfrigérants qui limitent le risque de « mouillage » des étiquettes ou inscriptions sur les flacons).
Analyses	- Comptage particulaire : dénombrement des particules ; - Air, surfaces : choix des milieux et des conditions d'incubation fonction des MO recherchés ; 30 ± 2°C pour la FAR pendant 5 à 7 jours et à 22 ± 2°C pour une recherche ciblée de flore fongique pendant 5 à 7 jours ; - Eau : FAR à 22 ± 2°C pendant 68 ± 4 h, FAR à 36 ± 2°C pendant 44 ± 4 h (milieu minimum) et <i>P. aeruginosa</i> à 36 ± 2°C pendant 44 ± 4 h (milieu Pseudo CN) ou autre germe indicateur en fonction de l'écologie du réseau d'eau.
Résultats	- Comptage particulaire : résultats issus du compteur de particules (classe ISO) en fonction du nombre de particules par taille mesurée ; - Air, surfaces : ▪ dénombrement en UFC/m³ pour l'air et en UFC/par surface prélevée pour les surfaces ▪ validation par comparaison aux valeurs cibles définies ± identification des micro-organismes potentiellement pathogènes (MO indicateurs) ; - Eau : dénombrement des colonies en UFC/mL pour la FAR et en UFC/100 mL pour <i>P. aeruginosa</i> et validation par rapport aux valeurs cibles.
Interprétation	- Comparer les valeurs obtenues aux valeurs cibles prédéfinies, mais également entre elles dans le temps afin de faire un suivi de tendance - Comptage particulaire : comparer à la classe ISO attendue - Air, surfaces : ▪ nombre de colonies (résultat quantitatif) : (cf tableaux 23, 25, 30 et 32) ▪ MO indicateurs : analyser le risque et mettre en place des mesures correctives - Eau : ▪ ESS : cf tableau 29 ▪ EBM : cf tableau 29 ▪ <i>P. aeruginosa</i> : < 1 UFC/100 mL.

⁷⁶ L'échantillon doit être prélevé avec un appareil ayant un débit suffisant pour ne pas dessécher le milieu de culture (Ex 100L/min) suivant l'ISO 14698-1.

⁷⁷ Le risque potentiel de dessèchement de la gélose au cours d'un prélèvement de 1000L peut inciter à réaliser 2 prélèvements de 500 L (24).

Fiche pratique 4 : Contrôles de l'environnement à la stérilisation																																
Zone de conditionnement (ISO 8) (+ zones « matériel stérile » et sortie et stock si ISO 8)																																
Objectifs	- Quantifier les particules en fonction de leur diamètre (classe particulaire) ; - Rechercher des micro-organismes dans l'air, sur les surfaces et dans l'eau (quantifier et identifier si besoin).																															
Stratégie	- Cadre réglementaire : Circulaire DGS/VS2-DH/EM1/EQ1 n° 97-672 du 20 octobre 1997 relative à la stérilisation des dispositifs médicaux dans les établissements de santé, BPPH ⁽¹⁰⁾ ; - Recommandations : AFS ⁽¹¹⁾.																															
Cahier des charges : spécificités choix du laboratoire	- Préciser s'il s'agit d'une qualification ⁷⁸ ou d'un contrôle d'une zone en activité ou au repos ; - Mentionner s'il s'agit d'un contrôle particulaire (air) et/ou microbiologique (air, surfaces, eau) ; - Préciser le référentiel que devra utiliser le prestataire (NF EN ISO 14644-1 et 2 (2016), NF EN ISO 14698-1, recommandations AFS ⁽¹¹⁾ ...) ; - Demander que soit mentionné dans le compte rendu : activité ou repos, heure du prélèvement, heure de la fin du dernier nettoyage de la salle... ; - Préciser les caractéristiques du ou des appareils (certificat en cours de validité) ; - Indiquer les variables devant figurer dans le rapport : localisation des prélèvements, techniques et milieux de cultures utilisés...																															
Prélèvements	- Préleveur formé ou mieux habilité ; - Plan d'échantillonnage ⇒ Les points à surveiller prioritairement sont préalablement définis par une analyse de risque et reporté sur le plan des locaux ; - Prélèvement en activité (noter le nombre de personnes présentes) ou au repos après bionettoyage et temps de repos (BPPH ⁽¹⁰⁾ : la conception de l'installation doit permettre un temps « d'épuration » idéal de 20 minutes = temps repos de la salle) ; - Fiche de prélèvement ; - Fréquence minimale (d'après AFS ⁽¹¹⁾) :																															
	<table><tr><th>contrôle</th><th colspan="2">Air</th><th colspan="2">Surfaces</th><th>Eaux techniques*</th></tr><tr><th>Zone</th><th>CP au repos</th><th>Microbiologie en activité</th><th>Quantitatif</th><th>Qualitatif</th><th>Microbiologie</th></tr><tr><td>lavage</td><td colspan="2"></td><td rowspan="4">Semestriel</td><td rowspan="4">Si besoin (mauvais résultats quantitatifs)</td><td>Semestriel</td></tr><tr><td>Conditionnement</td><td rowspan="3">Annuel</td><td rowspan="3">Semestriel</td><td rowspan="4"></td></tr><tr><td>Sortie stérile</td></tr><tr><td>Stockage</td></tr><tr><td>annexes</td><td colspan="2"></td></tr></table>					contrôle	Air		Surfaces		Eaux techniques*	Zone	CP au repos	Microbiologie en activité	Quantitatif	Qualitatif	Microbiologie	lavage			Semestriel	Si besoin (mauvais résultats quantitatifs)	Semestriel	Conditionnement	Annuel	Semestriel		Sortie stérile	Stockage	annexes		
	contrôle	Air		Surfaces		Eaux techniques*																										
	Zone	CP au repos	Microbiologie en activité	Quantitatif	Qualitatif	Microbiologie																										
	lavage			Semestriel	Si besoin (mauvais résultats quantitatifs)	Semestriel																										
	Conditionnement	Annuel	Semestriel																													
	Sortie stérile																															
	Stockage																															
	annexes																															
	*.eaux techniques : adoucie et osmosée																															
- Volume minimal par point prélevé : ▪ pour l'aérobiocontamination : 1 m³ ; ▪ pour le comptage particulaire : (NF EN ISO 14644-1 et 2 (2016)), * durée minimale de prélèvement : 1 minute * volume minimal : 2 L ▪ pour les surfaces : la surface prélevée est au minimum de 20 cm² (boîte contact : empreinte de 25 cm²), ▪ pour l'eau : en fonction des analyses demandées (cf tableau 20) - Conditions de transport et délai d'acheminement : ▪ comptage particulaire : sans objet, ▪ aérobiocontamination, surfaces : géloses fermées, identifiées et acheminées dans les 12 heures au laboratoire à température ambiante (ne pas réfrigérer), ▪ eau : sauf indication contraire dans les normes spécifiques et si la durée du transport est supérieure à 8 heures, réfrigérer les échantillons (5±3°C) pendant le transport (préférer les blocs réfrigérants qui limitent le risque de « mouillage » des étiquettes ou inscriptions sur les flacons).																																
Analyse	- Comptage particulaire : dénombrement des particules ≥ à 0,5, 1 et 5 µm ; - Air, surfaces : choix des milieux et des conditions d'incubation fonction des MO recherchés : l'AFS ⁽¹¹⁾ recommande : ▪ FAR : milieu type tryptone caséine soja, 30 ± 1°C, 3 à 5 jours, ▪ Moisissures : Sabouraud, 25 ± 1°C, 5 à 7 jours ; - Eau : FAR : milieux pauvres (R2A, TGEA), (20-22°C) pendant 7 jours⁷⁹, <i>P. aeruginosa</i> à 36 ± 2°C pendant 2 jours (milieu Pseudo CN) ou autre germe indicateur en fonction de l'écologie du réseau d'eau.																															
Résultats	- Comptage particulaire : conformité des résultats issus du compteur de particules en fonction du nombre de particules par taille mesurée (classe ISO 8) ; - Air, surfaces : dénombrement en UFC/m³ pour l'air, en UFC/par surface prélevée pour les surfaces et validation par comparaison aux valeurs cibles prédéfinies ± identification des micro-organismes potentiellement pathogènes (MO indicateurs) ; - Eau : dénombrement des colonies en UFC/mL pour la FAR et en UCF/100 mL pour EBM et <i>P. aeruginosa</i>.																															
Interprétation	- L'interprétation est effectuée conjointement par le pharmacien responsable de la stérilisation et l'EOH - Comptage particulaire : conformité à la classe attendue : ISO 8 (au repos) ; nombre maximal de particules par m³ : ▪ au repos : 3 520 000 pour les particules ≥0,5 µm, 832 000 pour celles ≥ 1 µm et 29 300 pour celles ≥5 µm ▪ en activité : non défini - Air, surfaces : valeurs cibles AFS ⁽¹¹⁾ : air ≤ 200 UFC/m³ en activité et ≤ 100 UFC/m³ au repos ; surfaces en fonction des zones (cf tableau 32 page 94) + suivi de tendances et, si MO indicateurs : analyser le risque et mettre en place des mesures correctives. - Eau du réseau : critères de potabilité ⇒ se référer aux résultats de l'ES ; <i>P. aeruginosa</i> (ou autre germe indicateur) < 1 UFC/100 mL. - Eaux techniques (adoucie et osmosée) : ▪ pas de critères spécifiés (pour AFS ⁽¹¹⁾ = FAR ≤ 1000 UFC/mL et <i>P. aeruginosa</i> ≤ 10 UFC/100 mL) : ▪ les valeurs cibles seront établies par le pharmacien en fonction de la maîtrise de l'installation : on peut prendre comme valeurs cibles celles de l'ESS (même techniques de contrôles)																															

⁷⁸ Les qualifications d'installation et opérationnelle complètes comprennent *a minima* : la classification bactériologique, la classification particulaire, la cinétique d'élimination des particules et le taux de renouvellement (cf annexe 5).

Fiche pratique 5 : Contrôles d'environnement en thérapie cellulaire (ZAC : zone à atmosphère contrôlée)

Objectifs	- Quantifier les particules en fonction de leur diamètre (classe particulaire) ; - Rechercher des micro-organismes dans l'air, sur les surfaces et dans l'eau (quantifier et identifier si besoin).																																																			
Stratégie	- Réglementaire (agence de biomédecine) : Décision du 27 octobre 2010⁽¹²⁾ ; - PSM : NF EN 12469 (2000).																																																			
Cahier des charges : spécificités choix du laboratoire	- Lors de la mise en route initiale d'une ZAC, il est procédé à une qualification comprenant les phases de QI, QO et QP (annexe 5). Les tests de QO et QP couvriront au minimum des tests suivants : pressions relatives des locaux, débits d'air et taux de renouvellement, laminarité des flux unidirectionnels, intégrité et étanchéité des filtres terminaux, classes de propreté particulaire au repos et en activité, classe de propreté microbiologique en activité, cinétiques d'autodécontamination ; - Type de classes : A à D ; - Les prélèvements microbiologiques sont réalisés dans la mesure du possible par des techniques d'impaction pour l'air et par une méthode de plaque contact ou à l'aide d'un écouvillonnage pour les surfaces ; - Les prélèvements microbiologiques sont effectués quand la zone est en activité et quand le système est le plus sollicité, par exemple vers la fin d'une session de travail.																																																			
Prélèvements	- Plan d'échantillonnage ⇒ les points à surveiller prioritairement sont préalablement définis par une analyse de risque et reporté sur le plan des locaux ; - Prélèvement en activité et au repos (Temps d'épuration : 15 à 20 minutes⁽¹²⁾) ; - Fiche de prélèvement ; - Fréquence⁽¹²⁾ <table><tr><th rowspan="2">Classe</th><th colspan="2">Contrôles particuliers</th><th colspan="2">Contrôles microbiologiques en activité</th><th rowspan="2">Cinétique décontamination (CP_{0,5})</th><th rowspan="2">Intégrité des filtres</th></tr><tr><th>repos</th><th>activité</th><th>surfaces</th><th>air</th></tr><tr><td>A</td><td rowspan="2">6 mois</td><td rowspan="2">6 mois</td><td rowspan="3">1 mois</td><td>3 mois</td><td rowspan="3">En fonction d'une analyse de risque</td><td rowspan="3">2 ans et lors des changements de filtres</td></tr><tr><td>B</td><td>6 mois</td></tr><tr><td>C</td><td rowspan="2">12 mois</td><td rowspan="2">12 mois</td><td>6 mois</td></tr><tr><td>D</td></tr></table> - Volume minimal classe A et B⁽¹²⁾ pour comptage particulaire : 1 m³ ; - Conditions de transport et délai d'acheminement : ▪ comptage particulaire : sans objet, - Aérobiocontamination, surfaces : Géloses fermées, identifiées et acheminées dans les 12 heures au laboratoire à température ambiante (ne pas réfrigérer).	Classe	Contrôles particuliers		Contrôles microbiologiques en activité		Cinétique décontamination (CP _{0,5})	Intégrité des filtres	repos	activité	surfaces	air	A	6 mois	6 mois	1 mois	3 mois	En fonction d'une analyse de risque	2 ans et lors des changements de filtres	B	6 mois	C	12 mois	12 mois	6 mois	D																										
Classe	Contrôles particuliers		Contrôles microbiologiques en activité		Cinétique décontamination (CP _{0,5})	Intégrité des filtres																																														
	repos	activité	surfaces	air																																																
A	6 mois	6 mois	1 mois	3 mois	En fonction d'une analyse de risque	2 ans et lors des changements de filtres																																														
B				6 mois																																																
C	12 mois	12 mois		6 mois																																																
D																																																				
Analyses	- Comptage particulaire: dénombrement des particules ≥ à 0,5 et 5⁸⁰ μm ; - Microbiologie : la décision du 27 octobre 2010⁽¹²⁾ préconise : ▪ température d'incubation comprise entre 30°C et 35°C pour la recherche de la flore mésophile et une température comprise entre 20 et 25°C pour la croissance des moisissures ; - Durée totale d'incubation de 2 à 5 jours pour la flore mésophile et de 5 à 7 jours pour les moisissures.																																																			
Résultats	- Comptage particulaire : résultats issus du compteur de particules : dénombrement des particules en fonction de leur taille ; - Air, surfaces : ▪ dénombrement en UFC/m³ pour l'air, en UFC/25 cm² et validation par rapport aux valeurs cibles définies, ▪ identification des micro-organismes potentiellement pathogènes ; - Eau : dénombrement des colonies en UFC/mL (FAR) et en UCF/100 mL (<i>P. aeruginosa</i>).																																																			
Interprétation	- Classe particulaire <table><tr><th rowspan="2">Classe</th><th colspan="4">Nombre maximal admissible de particules par m³ de taille égale ou supérieure à</th></tr><tr><th colspan="2">Au repos</th><th colspan="2">En activité</th></tr><tr><td></td><td>0,5 μm</td><td>5 μm</td><td>0,5 μm</td><td>5 μm</td></tr><tr><td>A</td><td>3 250</td><td>20</td><td>3 250</td><td>29</td></tr><tr><td>B</td><td>3 250</td><td>29</td><td>352 000</td><td>2 900</td></tr><tr><td>C</td><td>352 000</td><td>2 900</td><td>3 520 000</td><td>29 000</td></tr><tr><td>D</td><td>3 520 000</td><td>29 000</td><td>non défini</td><td>non défini</td></tr></table> - Microbiologie air et surfaces en activité (12)) (au repos : il n'y a pas valeurs cibles définies par la décision de 2010 (12), elles pourront être définies l'utilisateur) : <table><tr><th rowspan="2">Classe</th><th colspan="2">Concentration maximale admissible (FAR par point de prélèvement contrôlé en activité)</th></tr><tr><th>Surfaces (UFC/25cm²)</th><th>Air (UFC/m³)</th></tr><tr><td>A</td><td>< 1</td><td>< 1</td></tr><tr><td>B</td><td>5</td><td>10</td></tr><tr><td>C</td><td>25</td><td>100</td></tr><tr><td>D</td><td>50</td><td>200</td></tr></table> - L'acceptation d'un dépassement de valeur ne peut être qu'exceptionnel et doit être justifié ; - Pour la classe A (et la classe B au repos), la détection répétée ou régulière de faibles quantités de particules ≥ 5 μm est le signe d'une éventuelle contamination et nécessite la recherche de l'origine de la contamination et le cas échéant de la mise en place de mesures correctives et préventives ; - Dans tous les cas, la découverte de moisissures est considérée comme une non-conformité et des mesures correctives sont mises en place.	Classe	Nombre maximal admissible de particules par m ³ de taille égale ou supérieure à				Au repos		En activité			0,5 μm	5 μm	0,5 μm	5 μm	A	3 250	20	3 250	29	B	3 250	29	352 000	2 900	C	352 000	2 900	3 520 000	29 000	D	3 520 000	29 000	non défini	non défini	Classe	Concentration maximale admissible (FAR par point de prélèvement contrôlé en activité)		Surfaces (UFC/25cm ²)	Air (UFC/m ³)	A	< 1	< 1	B	5	10	C	25	100	D	50	200
Classe	Nombre maximal admissible de particules par m ³ de taille égale ou supérieure à																																																			
	Au repos		En activité																																																	
	0,5 μm	5 μm	0,5 μm	5 μm																																																
A	3 250	20	3 250	29																																																
B	3 250	29	352 000	2 900																																																
C	352 000	2 900	3 520 000	29 000																																																
D	3 520 000	29 000	non défini	non défini																																																
Classe	Concentration maximale admissible (FAR par point de prélèvement contrôlé en activité)																																																			
	Surfaces (UFC/25cm ²)	Air (UFC/m ³)																																																		
A	< 1	< 1																																																		
B	5	10																																																		
C	25	100																																																		
D	50	200																																																		
Remarque	Si présence de points d'eau se référer aux tableaux 10, 12, 20 et 29																																																			

⁸⁰ Pour la classe ISO 5 : les limites de l'échantillonnage et de l'exploitation statistique des résultats rendent inappropriés la mesure des particules de taille $\geq 5 \mu\text{m}$ du fait de leur faible quantité dans cette classe de risque (NF EN ISO 14644-1 et 2 (2016)).

Fiche pratique 6 : Contrôles d'environnement à la Pharmacie à usage interne (PUI) (ZAC : zone à atmosphère contrôlée)																																																																			
Objectifs	- Quantifier les particules en fonction de leur diamètre (classe particulaire) ; - Rechercher des micro-organismes dans l'air, sur les surfaces et dans l'eau (quantifier et identifier si besoin).																																																																		
Stratégie	- Les contrôles s'intègrent dans le système qualité pharmaceutique (BPPH⁽¹⁰⁾, BPP⁽¹³⁾ et BPF⁽¹⁶⁾) ; - Les locaux et le matériel destinés à être utilisés dans les opérations de fabrication critiques pour la qualité des produits sont soumis à une qualification appropriée ; - Le contrôle est réalisé hors et en activité à la pharmacie : les référentiels⁽¹⁰⁾⁽¹⁶⁾ prévoient des valeurs cibles « en activité ».																																																																		
Cahier des charges : spécificités choix du laboratoire	- Préciser si qualification ou contrôles de « routine » ; prévoir les modalités de nouveaux contrôles en cas de résultats non-conformes ; - Préciser les modalités des contrôles : en activité et/ou hors activité (pour les contrôles en activité, prévoir qu'ils soient réalisés au pic de l'activité) ; - Préciser les contrôles demandés : air (comptage particulaire, aérobiocontamination, sédimentation), eau, surfaces... ; - Préciser les référentiels et/ou normes à utiliser ; - Pour le comptage particulaire préciser la nécessité de compter 3 tailles de particule $\geq 0,5$; 1 et 5 μm (BPPH⁽¹⁰⁾) ou $\geq 0,5$ et 5 μm (BPP⁽¹³⁾ et BPF⁽¹⁶⁾) ; - La qualité de l'eau utilisée pour les différentes opérations de préparation des dispositifs médicaux stériles est évaluée, maîtrisée et surveillée. Compte tenu du risque nosocomial particulier, les analyses périodiques des différentes eaux utilisées sont complétées, en tant que de besoin, par des études microbiologiques de germes opportunistes (BPPH⁽¹⁰⁾)																																																																		
Prélèvements	- Préleveur formé ou mieux habilité ; - Plan d'échantillonnage $\Rightarrow$ Les points à surveiller prioritairement sont préalablement définis par une analyse de risque et reporté sur le plan des locaux ; - Prélèvement en activité (noter le nombre de personnes présentes) ou au repos après bionettoyage et temps de repos (BPPH⁽¹⁰⁾) : la conception de l'installation doit permettre un temps « d'épuration » idéal de 20 min = temps repos de la salle ; - Fiche de prélèvement ; - Fréquence : « des procédures précisent l'organisation et la fréquence des contrôles d'environnement par un personnel compétent et selon des méthodes validées » (BPPH⁽¹⁰⁾) ; - Volume minimal : ▪ pour l'air : aérobiocontamination : 1 m³ ; * pour le comptage particulaire : temps minimum de prélèvement = 1 minute (NF EN ISO 14644-1 et 2 (2016)), * volume minimal : fonction de la classe ISO et des diamètres de référence (annexe 3) ▪ pour les surfaces : la surface prélevée est au minimum de 20 cm² (boite contact : empreinte de 25 cm²), ▪ pour l'eau : en fonction des analyses demandées (tableaux 10 et 12) - Conditions de transport et délai d'acheminement : ▪ comptage particulaire : sans objet, ▪ aérobiocontamination, surfaces : géloses fermées, identifiées et acheminées dans les 12 heures au laboratoire à température ambiante (ne pas réfrigérer), ▪ eau : sauf indication contraire dans les normes spécifiques et si la durée du transport est supérieure à 8 heures, réfrigérer les échantillons (5$\pm$3°C) pendant le transport (préférer les blocs réfrigérants qui limitent le risque de « mouillage » des étiquettes ou inscriptions sur les flacons).																																																																		
Analyses	- Comptage particulaire : dénombrement des particules $\geq 0,5$, 1 et 5 μm - Air, surfaces : choix des milieux et des conditions d'incubation fonction des MO recherchés : 30 $\pm$ 2°C pendant 5 à 7 jours pour la FAR et 20 $\pm$ 2°C pendant 5 à 7 jours pour la flore fongique ; - Eau : FAR à 22 $\pm$ 2°C et 36 $\pm$ 2°C pendant 3 jours (milieu minimum) et <i>P. aeruginosa</i> à 36 $\pm$ 2°C pendant 2 jours (milieu Pseudo CN).																																																																		
Résultats	- Comptage particulaire : résultats issus du compteur de particules (classe ISO) ; - Air, surfaces : ▪ dénombrement en UFC/m³ pour l'air et en UFC/par surface prélevée pour les surfaces, ▪ validation par comparaison aux valeurs cibles définies $\pm$ identification des micro-organismes potentiellement pathogènes (MO indicateurs) ; - Eau : dénombrement des colonies en UFC/mL (FAR) et en UCF/100 mL (<i>P. aeruginosa</i>).																																																																		
Interprétation	- Comptage particulaire (BPPH⁽¹⁰⁾, BPP⁽¹³⁾⁽⁸²⁾ : <table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="3">Classe</th><th colspan="4">Nombre maximal admissible de particules par m³ de taille égale ou supérieure à</th></tr> <tr> <th colspan="2">Au repos</th><th colspan="2">En activité</th></tr> <tr> <th>0,5 μm</th><th>5 μm</th><th>0,5 μm</th><th>5 μm</th></tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td><td>3 250</td><td>20</td><td>3 250</td><td>29</td></tr> <tr> <td>B</td><td>3 250</td><td>29</td><td>352 000</td><td>2 900</td></tr> <tr> <td>C</td><td>352 000</td><td>2 900</td><td>3 520 000</td><td>29 000</td></tr> <tr> <td>D</td><td>3 520 000</td><td>29 000</td><td>non défini</td><td>non défini</td></tr> </tbody> </table> - Air et surfaces (BPPH⁽¹⁰⁾, BPP⁽¹³⁾) : <table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="5">Limites recommandées de contamination microbiologique (valeurs moyennes)</th></tr> <tr> <th>Classe</th><th>Echantillon d'air UFC/m³</th><th>Sédimentation sur boîtes de Pétri (diamètre 90 mm) UFC /4heures (*)</th><th>Géloses de contact (diamètre 55 mm) UFC /plaque</th><th>Empreintes de gant (5 doigts) UFC /gant</th></tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td><td>< 1</td><td><1</td><td><1</td><td><1</td></tr> <tr> <td>B</td><td>10</td><td>5</td><td>5</td><td>5</td></tr> <tr> <td>C</td><td>100</td><td>50</td><td>25</td><td>-</td></tr> <tr> <td>D</td><td>200</td><td>100</td><td>50</td><td>-</td></tr> </tbody> </table> * certaines boîtes peuvent être exposées pendant moins de 4 heures - Eau : conforme aux critères de potabilité mentionnés dans la réglementation (décret n° 89-3 du 3 janvier 1989 modifié, relatif aux eaux destinées à la consommation humaine) et pour les autres critères (cf tableau 29).				Classe	Nombre maximal admissible de particules par m ³ de taille égale ou supérieure à				Au repos		En activité		0,5 μm	5 μm	0,5 μm	5 μm	A	3 250	20	3 250	29	B	3 250	29	352 000	2 900	C	352 000	2 900	3 520 000	29 000	D	3 520 000	29 000	non défini	non défini	Limites recommandées de contamination microbiologique (valeurs moyennes)					Classe	Echantillon d'air UFC/m ³	Sédimentation sur boîtes de Pétri (diamètre 90 mm) UFC /4heures (*)	Géloses de contact (diamètre 55 mm) UFC /plaque	Empreintes de gant (5 doigts) UFC /gant	A	< 1	<1	<1	<1	B	10	5	5	5	C	100	50	25	-	D	200	100	50	-
Classe	Nombre maximal admissible de particules par m ³ de taille égale ou supérieure à																																																																		
	Au repos		En activité																																																																
	0,5 μm	5 μm	0,5 μm	5 μm																																																															
A	3 250	20	3 250	29																																																															
B	3 250	29	352 000	2 900																																																															
C	352 000	2 900	3 520 000	29 000																																																															
D	3 520 000	29 000	non défini	non défini																																																															
Limites recommandées de contamination microbiologique (valeurs moyennes)																																																																			
Classe	Echantillon d'air UFC/m ³	Sédimentation sur boîtes de Pétri (diamètre 90 mm) UFC /4heures (*)	Géloses de contact (diamètre 55 mm) UFC /plaque	Empreintes de gant (5 doigts) UFC /gant																																																															
A	< 1	<1	<1	<1																																																															
B	10	5	5	5																																																															
C	100	50	25	-																																																															
D	200	100	50	-																																																															

⁸¹ Pour la classe ISO 5 : les limites de l'échantillonnage et de l'exploitation statistique des résultats rendent inappropriés la mesure des particules de taille $\geq 5\mu\text{m}$ du fait de leur faible quantité dans cette classe de risque.

⁸² BPPH⁽¹⁰⁾ : comptage particulaire : la propreté particulaire respecte au minimum les caractéristiques de la classe 8 de la norme NF EN ISO 14644-1 et 2 (2016) au repos dans toutes les zones de conditionnement. Les caractéristiques particulières sont respectées en l'absence de personnel, à l'arrêt de toute activité, après un temps d'épuration de 20 minutes au minimum - aérobiocontamination ≤ 200 UFC/m³ « en activité ».

Fiche pratique 7 : Contrôle microbiologique d'un endoscope	
Objectifs	- Evaluer le niveau de contamination résiduelle des canaux de l'endoscope à un instant donné, dans le cadre d'un plan de surveillance programmé ou dans des circonstances particulières (contrôles ponctuels) ; - Contribuer à l'évaluation de l'action antimicrobienne des procédures de traitement en vigueur dans l'établissement ; - Contribuer à la qualification des ESET ; - Investiguer un ou plusieurs cas d'infection(s) associée(s) aux soins pouvant faire suspecter la responsabilité d'un endoscope.
Stratégie	- Contrôles programmés : ▪ prévoir la planification en début d'année, ▪ si possible une fois par an et par endoscope ou, à défaut, l'EOH et/ou le CLIN de chaque établissement définissent un échantillon représentatif par famille d'endoscopes et par centre de traitement en s'appuyant sur les critères suivants : ancienneté, fragilité et complexité des matériels, importance du parc d'endoscopes, fréquence d'utilisation, procédures de traitement des endoscopes qu'elles soient automatisées ou manuelles... ; - Contrôles ponctuels : ▪ état des lieux initial, ▪ retour de maintenance, ▪ alerte descendante de matériovigilance préconisant un contrôle, ▪ matériel neuf, ▪ matériel de prêt (appel d'offre ...), ▪ investigation d'un ou plusieurs cas d'infection(s) associée(s) aux soins pouvant faire suspecter la responsabilité d'un endoscope, ▪ lors de changements de processus de traitement : dans ce cas la nouvelle procédure est validée pour chaque famille d'endoscope, ▪ acquisition (qualification) ou prêt d'un nouveau dispositif ; - Survenue de cas groupés d'infections chez les patients (gestion des épidémies et pseudo «épidémies») afin de tenter d'isoler la souche environnementale pour comparaison à la souche patient. - Toute autre circonstance évaluée à risque, notamment à la levée de séquestration. - Qualification et requalification ESET et des LDE (cf annexe 5). Dans tous les cas, à l'exception de l'état des lieux initial, il est impératif d'attendre le résultat avant de mettre en circulation l'endoscope.
Cahier des charges : spécificités choix du laboratoire	- Analyse +/- prélèvement tel(s) que prévu(s) dans le guide du CTINILS ⁽³⁾ ; - Contrôle qualité externe souhaitable.
Prélèvements	- Dans une zone propre, suffisamment grande, du service d'endoscopie ou du lieu de stockage ; - Présence de 2 personnes formées aux prélèvements des endoscopes est souhaitable : une formée ou mieux habilitée aux prélèvements microbiologiques environnementaux et une ayant une bonne connaissance de l'architecture interne et aussi du fonctionnement des endoscopes ; - De façon générale, les endoscopes doivent être prélevés après avoir subi un cycle complet d'entretien et : ▪ pour les endoscopes utilisés en cavité stérile (et non stérilisables) : * soit en conditions d'utilisation : c'est-à-dire tout de suite après la désinfection, * soit en conditions « défavorables » pour « optimiser » la sensibilité le prélèvement : c'est à dire après un temps de latence qui est au moins de 6 heures et à condition que l'endoscope soit préservé des contaminations externes par un emballage (champ) stérile et que ces paramètres soit clairement précisés sur la fiche de prélèvement et sur le rapport d'essai (CR) ; ▪ pour les autres endoscopes : éviter de faire des prélèvements trop précoces (après désinfection de début de programme, après désinfection entre deux patients) qui risquent de s'avérer faussement négatifs ; une durée de stockage d'au moins 6 heures ⁽³⁾ est conseillée pour optimiser la sensibilité du prélèvement car elle peut permettre le développement de mo pour qu'ils soient plus facilement détectables ; - Prélèvement global des canaux en première intention ou individualisé dans le cadre d'un contrôle pour identifier le canal ou les canaux à l'origine d'un résultat global non conforme, en respectant les règles d'asepsie ; - Conditions telles que décrites dans le guide du CTINILS ⁽³⁾.
Analyses	- Au moins 80% du volume injecté doit être récupéré pour valider le prélèvement ; - Filtration de chaque échantillon sur membrane en nitrate de cellulose (taille des pores 0,45 µm), rinçage de la membrane, dépôt sur un milieu standard (TSA ou PCA), incubation à 30 ± 2°C en aérobiose et lecture à 48h, 72h, et jusqu'à 5 jours en cas de culture stérile.
Résultats	- Dénombrement de la FAR totale (nombre d'UFC/endoscope ou nombre d'UFC/canal) ; - Identification des micro-organismes « indicateurs » et/ou de micro-organismes potentiellement pathogènes.
Interprétation	- Critères d'interprétation : ▪ 3 niveaux : cible, alerte, action, ▪ dépendent du niveau de la qualité de l'eau de rinçage terminal et de criticité de l'acte ; - cf tableau 32

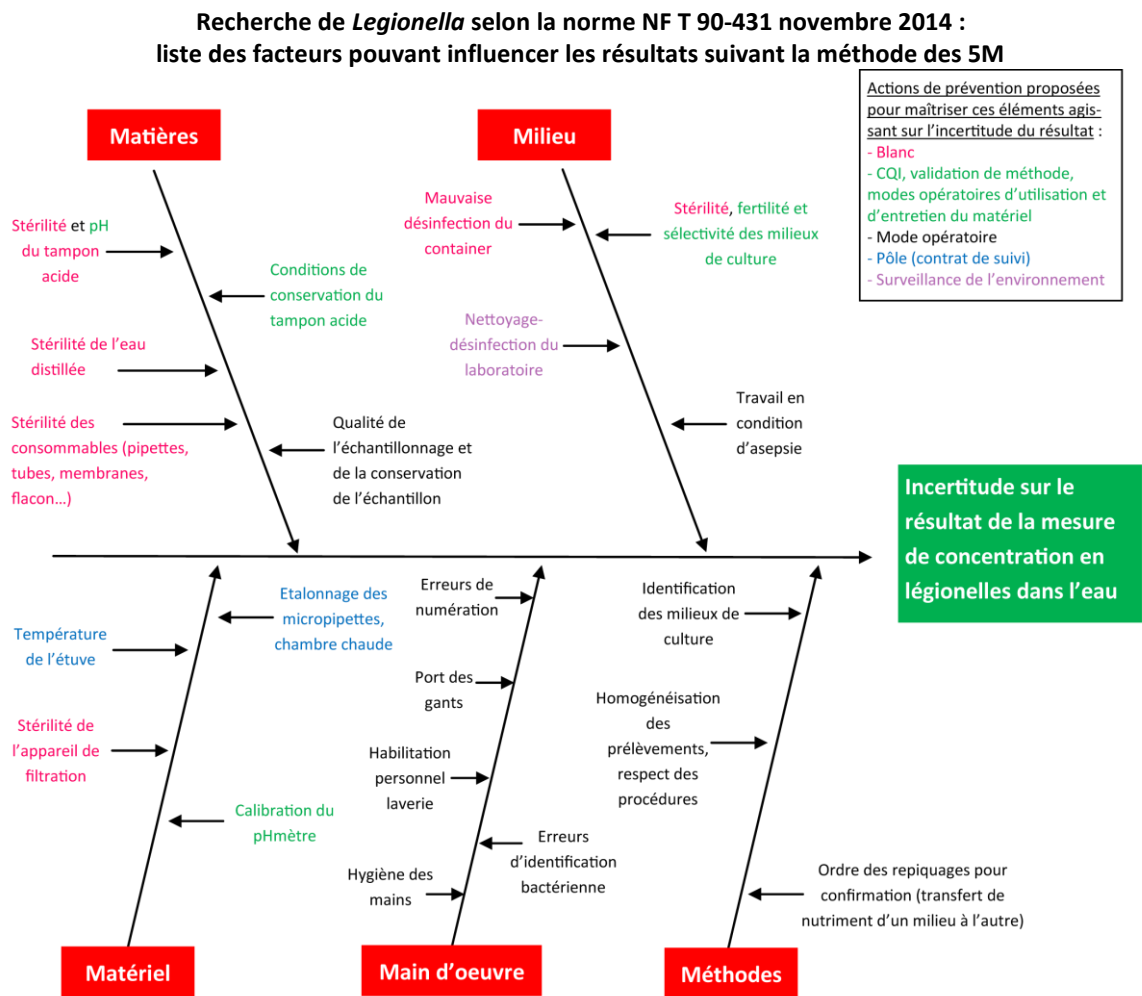
Attention : Une instruction est en cours de rédaction et sera publiée en 2016. C'est un document unique qui concerne le traitement des endoscopes souples thermosensibles. Dès sa parution, ce texte sera la référence réglementaire à appliquer.

Fiche pratique 8 : Contrôle microbiologique des eaux de rééducation (piscines, bains à remous, douches)																															
Objectif	Assurer la qualité microbiologique des eaux utilisées dans le service de rééducation fonctionnelle : piscines, bains à remous ⁸³ , douches (à jet et douches du vestiaire du service).																														
Stratégie	- Textes réglementaires pour les contrôles de légionelles (arrêté du 1^{er} février 2010, circulaires 2002 et 2010) ; - Cadre réglementaire des eaux de baignades et piscines (décret 2008) ; - Recommandations de l'ANSES^{(17) (18)} ; Les contrôles sont intégrés dans la gestion du risque sanitaire liés à l'eau dans l'ES, les protocoles sont validés et les résultats sont inscrits dans le carnet sanitaire de l'eau.																														
Cahier des charges : spécificités choix du laboratoire	- Les contrôles sont planifiés (hors présence patient) : programme de surveillance avec, si nécessaire, possibilité de réalisation de prélèvements et d'analyses complémentaires ; - Les contrôles de légionelles (douche et bains à remous) sont réalisés par un laboratoire accrédité pour le paramètre légionelles par le COFRAC ou tout autre organisme d'accréditation équivalent européen signataire de l'accord multilatéral pris dans le cadre de la coordination européenne des organismes d'accréditation ; - Un système d'alerte est prévu en cas de résultats non conformes (avant résultats définitifs).																														
Prélèvements	- Les modalités de prélèvements sont définies en accord avec le laboratoire ; - Le programme comporte le nombre et les dates prévisibles des prélèvements et analyses d'échantillons de l'eau ; - Le préleveur est formé ou mieux habilité ; - Pour les bassins, les prélèvements sont réalisés en des points où l'on s'attend à trouver le plus de baigneurs ou au plus grand risque de pollution, (sens inverse du flux) ; - Le prélèvement est effectué : ▪ en subsurface (-10 à -30 cm) pour les piscines et les bains à remous (figure 12), ▪ sans purge pour les douches à jet et les douches du vestiaire ; - Sauf indication contraire dans les normes spécifiques (légionelles) et si la durée du transport est supérieure à 8 heures, les échantillons sont réfrigérés ($5 \pm 3^{\circ}\text{C}$) pendant le transport (préférer les blocs réfrigérants qui limitent le risque de « mouillage » des étiquettes ou inscriptions sur les flacons, ...) ; - La fréquence est définie en fonction de la fréquentation des bassins et de l'analyse mais est <i>a minima</i> : <table border="1"> <thead> <tr> <th>Analyse</th><th>Piscine</th><th>Bains à remous Douches à jet</th><th>Douches (vestiaire)</th></tr> </thead> <tbody> <tr> <td>FAR à 36°C, <i>S. aureus</i> ; <i>E. coli</i>,</td><td rowspan="2">Mensuelle</td><td rowspan="2">Mensuelle</td><td rowspan="2">*</td></tr> <tr> <td><i>P. aeruginosa</i>,</td></tr> <tr> <td><i>Legionella</i></td><td>-</td><td>Trimestrielle</td><td>Annuelle</td></tr> </tbody> </table> * le contrôle est intégré dans le plan d'échantillonnage des ESS de l'établissement			Analyse	Piscine	Bains à remous Douches à jet	Douches (vestiaire)	FAR à 36°C, <i>S. aureus</i> ; <i>E. coli</i> ,	Mensuelle	Mensuelle	*	<i>P. aeruginosa</i> ,	<i>Legionella</i>	-	Trimestrielle	Annuelle															
Analyse	Piscine	Bains à remous Douches à jet	Douches (vestiaire)																												
FAR à 36°C, <i>S. aureus</i> ; <i>E. coli</i> ,	Mensuelle	Mensuelle	*																												
<i>P. aeruginosa</i> ,																															
<i>Legionella</i>	-	Trimestrielle	Annuelle																												
Analyses	Recherche : - pour les piscines : FAR à 36°C, <i>E. coli</i>, <i>P. aeruginosa</i>, <i>S. aureus</i>, - pour les bains à remous et les douches à jets : FAR à 36°C, <i>E. coli</i>, <i>P. aeruginosa</i>, <i>S. aureus</i>, <i>Legionella</i>, - pour les douches des vestiaires : FAR à 36°C, FAR à 22°C, <i>P. aeruginosa</i>, <i>coliformes totaux (E. coli)</i>, <i>Legionella</i>.																														
Résultats	- Pour <i>Legionella</i>, les résultats doivent être exprimés, en gardant deux chiffres significatifs, sous la forme : <i>Legionella</i> (UFC/litre) dont <i>Legionella pneumophila</i> (UFC/litre) ; - Pour les autres micro-organismes : ils sont exprimés en UFC/volume analysé.																														
Interprétation	Les valeurs cibles retenues sont celles proposées par l'ANSES^{(17) (18)} <table border="1"> <thead> <tr> <th>Micro-organismes</th><th>Piscine</th><th>Bains à remous, douches à jets</th><th>Douches (vestiaire)</th></tr> </thead> <tbody> <tr> <td>FAR à 36°C</td><td>< 100/mL</td><td>< 100/mL</td><td>≤ 10/mL</td></tr> <tr> <td>FAR à 22°C</td><td></td><td></td><td>≤ 100/mL</td></tr> <tr> <td><i>E. coli</i></td><td>< 1/100 mL</td><td>< 1/100 mL</td><td></td></tr> <tr> <td><i>P. aeruginosa</i></td><td>< 1/100 mL</td><td>< 1/100 mL</td><td>< 1/100 mL</td></tr> <tr> <td><i>S. aureus</i>**</td><td>< 1/100 mL</td><td>< 1/100 mL</td><td></td></tr> <tr> <td><i>Legionella</i></td><td></td><td>< seuil de détection et <i>L. pneumophila</i> non détectée</td><td>≤ 1000/L</td></tr> </tbody> </table> * Les piscines thermales et les piscines des centres de réadaptation fonctionnelle d'usage exclusivement médical ne sont pas soumises à cette réglementation. Les paramètres : carbone organique total (COT), turbidité, teneur en chlore combiné, pH doivent être contrôlés.			Micro-organismes	Piscine	Bains à remous, douches à jets	Douches (vestiaire)	FAR à 36°C	< 100/mL	< 100/mL	≤ 10/mL	FAR à 22°C			≤ 100/mL	<i>E. coli</i>	< 1/100 mL	< 1/100 mL		<i>P. aeruginosa</i>	< 1/100 mL	< 1/100 mL	< 1/100 mL	<i>S. aureus</i> **	< 1/100 mL	< 1/100 mL		<i>Legionella</i>		< seuil de détection et <i>L. pneumophila</i> non détectée	≤ 1000/L
Micro-organismes	Piscine	Bains à remous, douches à jets	Douches (vestiaire)																												
FAR à 36°C	< 100/mL	< 100/mL	≤ 10/mL																												
FAR à 22°C			≤ 100/mL																												
<i>E. coli</i>	< 1/100 mL	< 1/100 mL																													
<i>P. aeruginosa</i>	< 1/100 mL	< 1/100 mL	< 1/100 mL																												
<i>S. aureus</i> **	< 1/100 mL	< 1/100 mL																													
<i>Legionella</i>		< seuil de détection et <i>L. pneumophila</i> non détectée	≤ 1000/L																												

⁸³ Bains à remous : non vidangé à chaque patient, les baignoires médicales vidangées et nettoyées entre chaque patient ne sont pas concernées (valeur cible = ESS et contrôle légionelles pour la douchette intégré dans le plan d'échantillonnage de l'ES).

Annexes

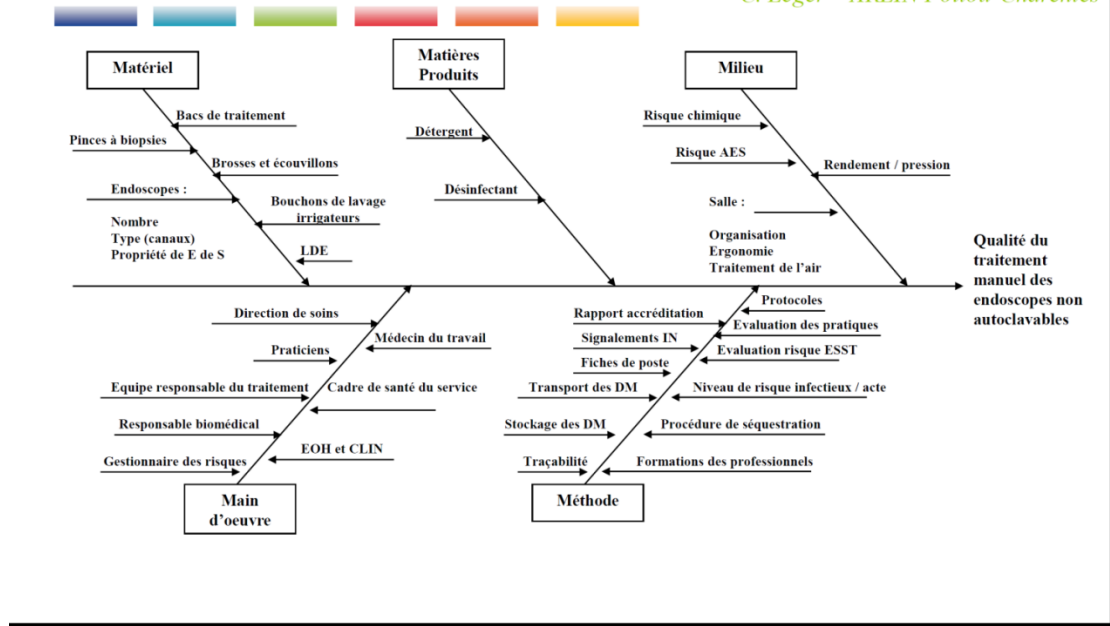
Annexe 1 - Exemples de diagramme des causes



V02 avril 2015
CHU Poitiers, Unité d'hygiène

Exemple : facteurs influençant la gestion des risques concernant le traitement manuel des endoscopes non autoclavables

C. Léger – ARLIN Poitou-Charentes



Annexe 2 - Les biocollecteurs : méthodes de prélèvement et caractéristiques

Généralités

Les contrôles de l'aérobiocontamination sont effectués avec des biocollecteurs. Le dispositif de prélèvement est choisi en fonction du type de particules viables à échantillonner et de leur sensibilité à la procédure d'échantillonnage, de la concentration attendue en particules viables dans la zone étudiée, de la capacité du biocollecteur à détecter de faibles niveaux de contamination, de l'effet de ce dispositif sur l'environnement à surveiller et du type d'information à obtenir (qualitatif ou quantitatif).

Tout dispositif actif de prélèvement doit répondre aux exigences de la norme NF EN ISO 14698-1 :

- aspirer un volume suffisamment important pour la détection de faible niveau de contamination ;
- avoir un débit suffisant pour prélever 1 m³ dans un laps de temps raisonnable (inférieur à 10 minutes) afin d'éviter le dessèchement du milieu de prélèvement ;
- permettre une vitesse appropriée d'impact de l'air sur le milieu de culture c'est à dire suffisamment élevée pour permettre le piégeage des particules viables de taille supérieure à 1 µm mais suffisamment faible pour garantir la viabilité de ces particules (cette vitesse est estimée à moins de 20 m/sec).

Les caractéristiques techniques sont également à prendre en compte :

- facilité de manipulation (poids, encombrement, maniabilité...) ;
- possibilité de nettoyage et désinfection de la surface externe de l'appareil et possibilité de stériliser les parties amovibles de l'appareil (cribles ou grilles) ;
- efficacité physique (capacité à prélever des particules de diverses dimensions) et efficacité microbiologique (efficacité lors du prélèvement de particules portant des micro-organismes) de l'appareil démontrées et certificat d'étalonnage fourni par le fabricant.

Les dispositifs

On distingue deux catégories de dispositifs de prélèvement microbiologique d'air : les appareils passifs (plaques de sédimentation) et les appareils actifs (échantillonneurs par impaction, filtration ou barbotage en milieu liquide).

- Les dispositifs passifs ou boîtes de sédimentation

La sédimentation est une méthode consistant à collecter des micro-organismes par gravité sur des boîtes de Pétri ouvertes contenant un milieu de culture gélosé. Il est nécessaire d'évaluer le temps de prélèvement optimum : un temps trop court a pour conséquence une sous-estimation de la biocontamination, un temps trop long entraîne le dessèchement du milieu de culture.

Cette méthode ne permet pas d'avoir un résultat quantitatif de l'aérobiocontamination mais peut servir pour évaluer le risque de biocontamination d'une surface ou d'un produit par voie aérienne en déterminant le nombre de particules viables sédimentées sur la boîte en fonction du temps d'exposition (au cours d'une manipulation technique par exemple). Ces dispositifs passifs sur boîte de Pétri sont peu utilisés en routine.

- Les dispositifs actifs

▪ par filtration :

La méthode par filtration d'air consiste à aspirer l'air au travers d'une membrane filtrante de gélatine, qui est ensuite mise en culture soit directement par application sur un milieu solide gélosé, soit après dissolution en milieu liquide. Cette méthode est peu utilisée car plus complexe. En effet, il est nécessaire de s'assurer que les conditions de filtration n'affectent pas la viabilité des micro-organismes recueillis.

▪ par impaction :

Un volume d'air connu est aspiré et impacté directement sur un milieu de culture gélosé. La méthode par impaction est la plus couramment utilisée.

Tableau 35 : Principes de fonctionnement des différents types d'échantillonneurs par impaction	
Méthode	Principe
Impaction à travers un crible ou une grille	Aspiration d'air au travers d'un crible, avec impaction des micro-organismes sur le milieu de culture
Impaction à travers une fente	Aspiration d'air au travers d'une fente qui se déplace sur le milieu de culture
Impaction par centrifugation	Aspiration à grande vitesse par une turbine à ailettes avec projection des micro-organismes sur un milieu de culture

- par barbotage en milieu liquide :
Les micro-organismes sont aspirés et transférés directement en milieu liquide, ce qui évite le risque de dessiccation de l'échantillon.
- par prélèvement cyclonique :
L'air est aspiré à un fort débit (300 L/min) par une entrée circulaire puis entraîné dans le cône dans un mouvement tourbillonnant, ce qui engendre la centrifugation des particules sur les parois du cône contenant un milieu liquide et la formation d'un vortex liquide qui balaye les parois. A la fin du prélèvement, un échantillon liquide concentré en particules est récupéré. Cependant, la centrifugation des micro-organismes dans le cyclone peut interférer avec leur cultivabilité. Le recueil en milieu liquide permet la culture et la recherche moléculaire.

Annexe 3 - les compteurs de particules

Généralités : les classes d'empoussièrement

D'après la norme NF EN ISO 14644-1 et 2 (2016), la classification d'une salle ou d'une zone propre est définie comme le niveau de propreté particulaire de l'air applicable à cette salle. Ce niveau est exprimé en termes de classes ISO, pour lesquelles sont définies des concentrations maximales admissibles pour chaque taille de particules (tableau 36).

Tableau 36 : Table pour la classification ISO en fonction de la taille des particules (d'après la norme NF EN ISO 14644-1 et 2 (2016))

Classe ISO	Concentration maximale (particules/m ³) pour les particules de taille supérieure ou égale à (a)			
	0,3 µm	0,5 µm	1 µm	5 µm
5	10 200	3 520	832	(b), (c)
6	102 000	35 200	8 320	293
7	(d)	352 000	83 200	2 930
8	(d)	3 520 000	832 000	29 300

- a) Les concentrations sont cumulatives : par exemple, pour la classe ISO 5 le nombre de 10 200 particules rapporté pour la taille de 0,3 µm prend en compte toutes les particules de taille $\geq 0,3$ µm.
- b) Les limites statistiques de l'échantillonnage pour les particules en faible concentration rendent la classification inappropriée.
- c) Les limites liées au prélèvement pour les particules en faible concentration et de taille supérieure à 1 µm rendent la classification inappropriée du fait de la perte potentielle dans le système de prélèvement.
- d) Non applicable du fait de la trop grande concentration en particules.

Les dispositifs : « compteurs de particules en suspension dans l'air en lumière dispersée pour espaces propres »

- Principe de la mesure

Les particules aspirées passent une zone éclairée (diode laser) et émettent des éclairs lumineux qui sont transformés en impulsions électriques mesurées et classées à l'aide d'une électronique appropriée. Le résultat est la concentration des particules supérieures à des niveaux dimensionnels (ex : nombre de particules de taille égale ou supérieure à 0,5 µm).

Depuis 2007, il existe une norme précisant les procédures d'étalonnage (ISO 21501-4 (2007)). Cette norme permet d'homogénéiser les réponses des compteurs de particules aéroportées mis sur le marché qui, depuis, sont couramment livrés avec un certificat d'étalonnage. De ce fait, la qualité de la mesure n'est plus vraiment un critère de sélection lors de l'achat d'un compteur de particules, mais il faut penser à demander la conformité à cette norme.

- Débit

Il existe 2 types de compteurs en fonction du débit de l'appareil :

- débit $\geq 28,3$ L/minutes pouvant aller jusqu'à 100 L/min
- débit faible : 2,83 L/minutes.

Attention seuls les compteurs répondant à la norme ISO 21501-4 (2007) permettent d'effectuer des prélèvements conformes (NF EN ISO 14644-1 et 2 (2016)). **Les autres ne permettent en aucun cas de valider une classe ISO** et les résultats sont rendus « bruts » (valeurs obtenues par points contrôlés) ; ils peuvent toutefois être utiles « en routine » pour détecter une dérive de ces valeurs brutes par rapport à un tableau de bord préalablement établi avec les mesures antérieures.

- Autres paramètres à prendre en compte

- le nombre de canaux du compteur prend en compte que, si on mesure plus d'une taille, chaque taille doit être au moins 1,5 fois supérieure à celle qui précède (par exemple pour 0,5 µm cela ferait : 0,5 x 1,5 soit 0,75...),
- l'ergonomie : poids (de 500 g à plus de 5 kg), boîtier résistant et facile à nettoyer-désinfecter, départ différé, manuel d'utilisation en français...,
- le volume de prélèvement ajustable ou prédéfini,
- la convivialité : taille de l'écran, menus intuitifs, consultation des données, alertes...,
- les données : tickets, transfert direct des données (Ethernet, USB...), édition de rapport...,
- la mémoire : stockage des données,
- la batterie : type et performance, autonomie,
- la maintenance : modalités, prêt de matériel...,

- les accessoires :
 - * sonde (capteur) isocinétique à utiliser avec des débits unidirectionnels (ex : PSM) pour maximiser la corrélation entre les comptages et la distribution de taille de particule réelle (parallèle à l'écoulement du flux et égalité de vitesse en amont et dans la sonde),
 - * tuyau pour permettre de raccorder les capteurs au compteur (attention aux pertes dues à la longueur du tuyau...).

Exemple de plan d'échantillonnage d'une salle d'opération ISO classe 7 (NF EN ISO 14644-1 et 2 (2016))

Il s'agit d'une salle d'opération de 38 m² de surface avec comme objectif de vérifier que la salle est ISO 7 pour les particules $\geq 0.5 \mu\text{m}$ et $\geq 5 \mu\text{m}$.

- Limites requises de la classe ISO 7 (tableau 36)

- pour les particules $\geq 0.5 \mu\text{m}$: $C_n (\geq 0.5 \mu\text{m}) = 352\,000 \text{ particules/m}^3$
- pour les particules $\geq 5 \mu\text{m}$: $C_n (\geq 5 \mu\text{m}) = 2\,930 \text{ particules/m}^3$

- Nombre de points de prélèvements requis : (tableau 7)

La norme NF EN ISO 14644-1 et 2 (2016) donne, pour une surface $\leq 36\text{m}^2$, le nombre de 9 points de prélèvements et pour la surface suivante $\geq 52\text{m}^2$, le nombre de 10 points.

Donc, pour une surface de 38 m² (> 36 et < 52), le nombre de points à prélever sera de 10 points.

- Localisation des points de prélèvements

Principes du choix des points d'échantillonnage :

- respecter au minimum le nombre de points requis⁸⁴ (tableau 7),
- diviser l'ensemble de la zone en secteurs de superficie égale,
- sélectionner dans chaque secteur un point représentatif des caractéristiques du secteur (figure 19)
- à chaque emplacement choisi, positionner la sonde du compteur de particules au niveau de la zone de travail

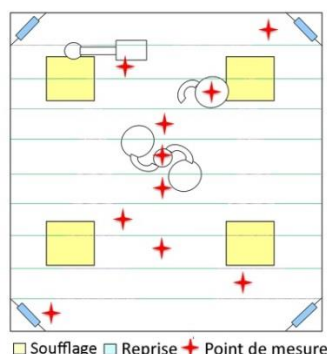


Figure 22 : Exemple de localisation des 10 points de prélèvements choisis pour une salle ISO 7 de chirurgie viscérale de 38 m² suivant la norme NF EN ISO 14644-1 et 2 (2016)

- Volume requis pour un échantillon et procédure

Le volume d'air prélevé doit permettre de détecter au minimum 20 particules pour la plus grande des tailles de particules choisies suivant la formule :

$$V = (20/C_{n,m}) \times 1000$$

$C_{n,m}$ est la plus grande concentration de particules pour la classe ISO(_n) et la plus grande taille de particules testée(_m).

Dans l'exemple : $C_{n,m}$ devient $C_{7,5}$ qui correspond, pour la classe ISO 7, au nombre limite de particules de taille $\geq 5 \mu\text{m}$ (plus grande taille testée) soit 2930 (cf tableau 36), ce qui donne :

$$V = (20/2930) \times 1000$$

$$V = 0,00682 \times 1000$$

$$V = 6,82 \text{ litres}$$

Dans cet exemple, le volume théorique prélevé par échantillon doit être de 6,82 litres sans oublier que la durée d'échantillonnage ne peut être inférieure à 1 minute.

Ainsi, si le compteur utilisé pour le test a un débit de 28,3 litres par minute, un volume de 28,3 litres par échantillon sera pris en compte pour chaque point de prélèvement pour tenir compte de ce temps minimum de prélèvement.

⁸⁴ Nombre de points minimal calculé qui garantit, avec au moins 95 % de confiance, qu'au moins 90 % de la surface de la salle propre ne dépasse pas les limites de la classe.

La sonde de prélèvement doit être placée pointant vers le flux d'air. Si la direction du flux d'air échantillonné n'est pas contrôlée ou prévisible (par exemple si le débit d'air est non-unidirectionnel), l'entrée de la sonde de prélèvement doit être dirigée verticalement vers le haut.

- Nombre d'échantillon par point

Pour chaque point de prélèvement, un seul échantillonnage peut être réalisé. Si plus de 2 échantillons sont effectués, seule la moyenne des prélèvements est prise en compte. Le nombre de particules par mètre cube est calculé.

- Les résultats

Dans cet exemple, le nombre d'échantillons par point est variable et les résultats sont les suivants :

- résultats des comptages pour les particules $\geq 0,5 \mu\text{m}$

Point de prélèvement	Résultat par échantillon					Moyenne pour 28,3 L	Moyenne pour 1 m ³	Limite $\geq 0,5 \mu\text{m}$	Résultat
	N°1	N°2	N°3	N°4	N°5				
1	4 421	5 362	3 952	1 156	2 531	3 484	122 999	352 000	OK
2	3 592					3 592	125 739		OK
3	1 260	1 170	650	980	680	948	33 464		OK
4	268	652				460	16 238		OK
5	11 236	8 534	7 589	6 892	7 231	8296	292 863		OK
6	3 824	5 621	2 348	5 364	2 832	3 998	141 112		OK
7	1 536	1 278	3 256	2 547	1 892	2 102	74 078		OK
8	2 598	7 698	8 837	3 986		5 780	204 025		OK
9	4 986	7 679	7 698	6 568	7 967	7 020	247 792		OK
10	14 403	15 205	12 603	11 204	10 610	12 805	452 002		Echec

- résultats des comptages pour les particules $\geq 5 \mu\text{m}$

Point de prélèvement	Résultat par échantillon					Moyenne pour 28,3 L	Moyenne pour 1 m ³	Limite $\geq 5 \mu\text{m}$	Résultat
	N°1	N°2	N°3	N°4	N°5				
1	4	5	3	0	2	3	99	2 930	OK
2	5					5	177		OK
3	7	9	10	11	6	9	304		OK
4	8	6				7	247		OK
5	3	5	2	4	0	3	99		OK
6	0	1	5	2	4	2	85		OK
7	0	1	0	0	1	0	14		OK
8	6	7	6	4		6	203		OK
9	5	2	0	1	3	2	78		OK
10	4	2	0	5	2	3	92		OK

- Conclusion des mesures

Pour les particules $\geq 5 \mu\text{m}$ les résultats sont conformes

Pour les particules $\geq 0,5 \mu\text{m}$:

- le point de prélèvement n°10, la concentration moyenne de 452 002 particules $\geq 0,5 \mu\text{m}$ par m³ ne répond pas aux critères de limite de concentration de la classe ISO 7 qui est de 352 000 ;
- pour le point de prélèvement n° 5, le comptage n°1 pris individuellement ne répond pas à la limite de concentration de la classe ISO 7 pour les particules $\geq 0,5 \mu\text{m}$. Cependant en prenant la moyenne des 5 comptages le résultat répond au critère demandé de la classe ISO 7. Le point est donc conforme.

En conclusion, l'ensemble des points de prélèvement ne répond pas au critère de la classe ISO 7 pour les particules $\geq 0,5 \mu\text{m}$ (point n°10). **La salle ne répond pas à la classification requise.**

- Rapport d'essai

Il doit comprendre :

- le nom et l'adresse de l'organisme d'essai, et la date à laquelle le test a été effectué;
- le nombre et l'année de publication de l'ISO (NF EN ISO 14644-1 et 2 (2016)) ;
- une identification claire de l'emplacement physique de la salle ou de la zone testée (y compris la référence à des zones adjacentes si nécessaire) et les désignations spécifiques pour les coordonnées de tous les sites d'échantillonnage (une représentation schématique peut être utile) ;
- les critères de description spécifiques à la salle, y compris la classification ISO, l'état (s) d'occupation pertinents, et la taille (s) considérée de particules ;
- les détails de la méthode d'essai utilisée, avec toutes les conditions particulières relatives aux mesures, ou la dérogation à la méthode d'essai et l'identification du compteur particulaire utilisé ;
- les résultats des tests incluent les données sur la concentration de particules pour tous les points d'échantillonnage.

Annexe 4 - Les milieux de culture et de prélèvement (liste non exhaustive)

Type de milieu de culture et de prélèvement	Caractéristiques	Utilisations	Exemples
Milieux « minimum »	Milieu pauvres (sans glucose)	Dénombrement des bactéries potentiellement « stressées »	PCA , R2A, TGEA
Milieux « standard »	Milieu de « base »	Dénombrement des bactéries sans exigences particulières de culture	TSA PCA avec glucose
Milieux enrichis	Supplémentation des milieux (sang, sérum...)	Recherche de bactéries à croissance exigeante	Gélose au sang Columbia Gélose chocolat ...
Milieux sélectifs	Addition de molécules empêchant la croissance de certains micro-organismes (molécules à action sélective)	Recherche(s) ciblée(s)	Pseudo CN ⇒ <i>P. aeruginosa</i> Chapman, Baid-Parker ⇒ <i>S. aureus</i> GVPC, BCYE avec ou sans L-cystéine ⇒ Légionelles TTC-Tergitol 7, VRBL ⇒ Coliformes Slanetz et Bartley ⇒ Enterocoques intestinaux
Milieu spécifiques pour recherche d'anaérobie	Incubation en anaérobiose + choix de milieu favorable à la croissance des bactéries anaérobies	Recherche des bactéries sulfito-réductrices	TSC TSN
Milieux spécifiques pour les champignons	Addition de composants favorable à la croissance des champignons	Recherche de champignons filamenteux	Malt Milieu de Sabouraud avec ou sans antibiotiques
Bouillon d'enrichissement	Sous forme liquide Peut contenir des agents neutralisants de l'activité résiduelle des désinfectants	Augmentation de la quantité de micro-organismes (Attention : Seul les germes dominants seront enrichis)	Bouillon nutritif (BHI)
Bouillon d'enrichissement sélectif	Sous forme liquide Contient des molécules à action sélective	Recherche ciblée Augmentation de la proportion d'un sous-groupe de micro-organismes dans un ensemble plus vaste	Bouillon VRE ⇒ entérocoque R vancomycine
Dispositifs spécifiques « prêts à l'emploi »	Forme bombée Contient des agents neutralisants de l'activité résiduelle des désinfectants	Prélèvement de surface	Boîte contact Lame gélosée
Solution de « décrochage »	Activité tensio-active pour optimiser la récupération des micro-organismes Contient des agents neutralisants de l'activité résiduelle des désinfectants	Prélèvement des endoscopes	DNP (diluant neutralisant Pharmacopée) + Thiosulfate

Annexe 5 - Les qualifications

Les définitions varient en fonction des normes et des référentiels. Nous en rapportons quelques exemples ci-après.

Suivant les « normes » (figure 23)

Qualification : Processus consistant à déterminer si une entité (activité ou processus, produit, organisme, ou toute combinaison de cet ensemble) est capable de satisfaire aux exigences spécifiées. (NF EN ISO 14698-1 (2004)).

Qualification d'installation : Opération composée d'une série systématique de contrôles, de réglages, de mesurages et d'essais devant être effectuée, en vue de vérifier la conformité de chaque élément et étape de l'installation réalisée, selon les exigences du cahier des charges et des documents. (NF S90-351 (2013)).

Qualification fonctionnelle ou opérationnelle : Opération composée d'une série d'essais et de mesurages devant être effectuée en vue de vérifier que tous les éléments de l'installation fonctionnent ensemble pour atteindre les conditions requises dans l'état d'occupation « après construction » ou « au repos », les équipements dédiés à l'activité étant présents et sous tension (NF S90-351 (2013)).

Qualification de performance : Vérification documentée que les installations, systèmes et équipements tels qu'ils sont installés sont en mesure de fonctionner de manière efficace et reproductible dans des conditions réelles d'analyse, de production,... (Vérification des performances du système complet, confirmation que l'appareillage continue régulièrement à fonctionner comme prévu).

Requalification : Accomplissement de la série d'essais spécifiée pour l'installation, afin de démontrer le maintien de sa conformité avec la NF EN ISO 14644-1 (2004) à la classification spécifiée, comprenant la vérification des conditions préalables exigées pour les essais (NF EN ISO 14644-2 (2004)).

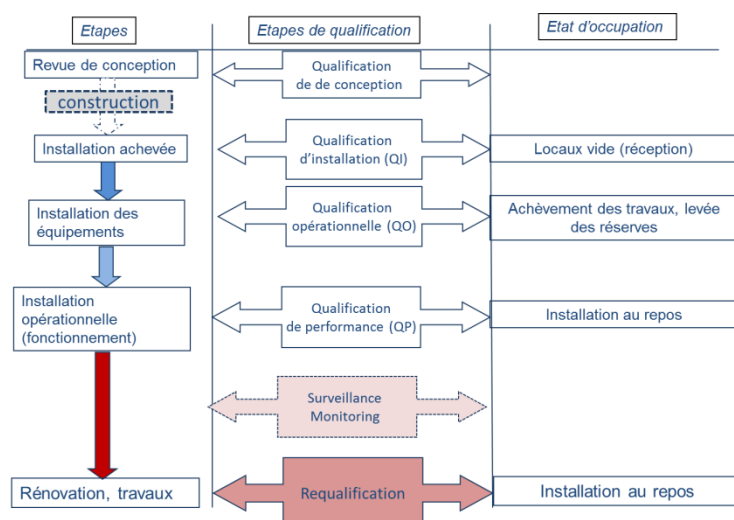


Figure 23 : Représentation schématique du déroulement des qualifications d'après la norme NF S90-351 (2013)

Suivant les « BPF »⁽¹⁶⁾

Qualification de l'installation (QI) : Vérification documentée que les installations, systèmes et équipements, tels qu'ils ont été installés ou modifiés, sont conformes à la conception approuvée et aux recommandations du fabricant.

Qualification opérationnelle (QO) : Vérification documentée que les installations, systèmes et équipements, tels qu'ils ont été installés ou modifiés, fonctionnent comme prévu sur toute la gamme d'exploitation.

Qualification des performances (QP) : Vérification documentée que les installations, systèmes et équipements, tels qu'ils ont été agencés, sont en mesure de fonctionner de manière efficace et reproductible, sur la base de la méthode opérationnelle approuvée et de la spécification du produit.

Revalidation : Renouvellement de la validation du procédé en vue de démontrer que les changements introduits dans le procédé/équipement conformément aux procédures de maîtrise des changements ne comportent aucun risque pour les caractéristiques du procédé et la qualité du produit.

Qualification de conception : Vérification documentée que la conception proposée des installations, systèmes et équipements convient aux usages auxquels ils sont destinés.

Suivant la décision de 2010 pour la « Thérapie cellulaire »⁽¹²⁾

Qualification : Opération destinée à démontrer l'aptitude d'un matériel, d'un système, d'un dispositif, d'une installation, à satisfaire les exigences de qualité et de sécurité spécifiées. La qualification d'un de ces éléments nécessite que soient réalisés le processus de qualification de conception, si nécessaire, ainsi que les processus de qualification d'installation, opérationnelle et de performance.

Qualification de conception (QC) : Vérification documentée que la conception proposée des installations, systèmes et matériels réalisés à façon convient aux usages auxquels ils sont destinés. Il s'agit du premier élément de la validation de nouveaux systèmes, installations ou matériels.

Qualification d'installation (QI) : Vérification documentée que les installations, systèmes, matériels et équipements, tels qu'ils ont été installés ou modifiés, sont conformes aux spécifications réglementaires et à celles du cahier des charges et que les recommandations du fournisseur ont été prises en compte. Elle comporte au minimum les éléments suivants :

- localisation, état et raccordements,
- appareillages de mesures et étalonnage,
- matériaux et soudures, si nécessaire,
- documentation de mise en service, emploi et entretien,
- plans d'installation.

Qualification opérationnelle (QO) : vérification documentée que les installations, systèmes, matériels et équipements, tels qu'ils ont été installés ou modifiés, fonctionnent comme prévu sur toute la gamme d'exploitation. Elle succède à une qualification d'installation satisfaisante. Elle comporte au minimum les éléments suivants :

- essais de fonctionnement de l'installation, du système ou du matériel correspondant aux besoins du procédé,
- essais réalisés dans les conditions limites d'utilisation.

Qualification de performance (QP) : vérification documentée que les installations, systèmes, matériels et équipements, tels qu'ils ont été agencés et dans des conditions réelles ou simulées d'utilisation, fonctionnent correctement et de façon reproductible et permettent d'obtenir les spécifications attendues sur le produit. Elle doit suivre le passage réussi des étapes de qualification d'installation et opérationnelle. Elle comporte au minimum les éléments suivants :

- essais réalisés avec la mise en œuvre de tissus, de leurs dérivés, PTC ou autres produits habituellement utilisés dans le cadre des procédés de préparation ou d'analyse ;
- essais réalisés dans les conditions limites d'utilisation.

Suivant les référentiels pour les « LDE et ESET »

Les LDE⁽⁴⁾

La qualification du LDE comprend :

La qualification de l'installation (QI) : Elle repose sur les tests réalisés par le fabricant ou l'installateur lors de l'installation, pour s'assurer que tous les services nécessaires ont bien été correctement fournis et connectés et que le laveur désinfecteur peut fonctionner en toute sécurité (NF EN 61010-2 (2011): Règles de sécurité pour appareils électriques de mesurage, de régulation et de laboratoire - Partie 1 : exigences générales),

La qualification opérationnelle (QO) : La qualification de l'installation et la qualification opérationnelle doivent permettre de démontrer que le laveur désinfecteur et les services auxquels il est connecté (eau, air, électricité...) sont conformes aux recommandations du fabricant. Ces tests sont généralement réalisés par le fabricant ou l'installateur, et permettent de s'assurer que les paramètres critiques du ou des cycles sont conformes aux spécifications du fabricant (durée de chaque phase, température, concentration en produit,...) et que les différents endoscopes du service peuvent être traités dans la machine.

La qualification des performances (QP) doit être effectuée après que la qualification de l'installation et la qualification opérationnelle ont été faites. Elle est souvent réalisée par l'utilisateur après entente avec le fabricant. La qualification des performances doit permettre de vérifier que les exigences attendues en terme de lavage, désinfection, rinçage et séchage sont bien atteintes une fois que la machine a été installée et que les paramètres critiques ont été vérifiés (prélèvements d'eau, d'endoscope...).

La requalification consiste à répéter une partie ou la totalité des tests de validation pour vérifier la fiabilité du système. En fonction du type d'incident ayant nécessité la requalification ces tests peuvent être effectués par l'utilisateur ou nécessiter l'intervention du fabricant. Une requalification doit être effectuée par exemple :

- si des changements ou des travaux ont été effectués sur la machine et que ces derniers sont susceptibles d'avoir modifié les performances du laveur désinfecteur.
- si les enregistrements des tests de routine indiquent une déviation inacceptable des paramètres par rapport aux enregistrements effectués lors de la validation.
- si les performances du laveur désinfecteur sont inacceptables.

Toute modification des paramètres des cycles risque d'affecter la qualité des cycles et nécessite l'accord du fabricant voire une requalification du LDE.

Les ESET

Qualification des performances ESET

L'objectif de cette étape est de vérifier la capacité de l'enceinte à maintenir la qualité microbiologique des endoscopes susceptibles d'être stockés dans l'ESET.

Lors de la qualification des performances, un échantillon significatif du parc d'endoscopes (un exemplaire de chaque famille d'endoscopes et un nombre d'endoscopes correspondant à au moins un tiers de la capacité totale de l'enceinte) est prélevé après stockage. Les méthodes de prélèvement, d'analyse et d'interprétation sont décrites dans le guide de mars 2007 ⁽²⁴⁾.

L'obtention d'un résultat microbiologique non conforme pour un endoscope considéré ne permet pas d'utiliser l'ESET pour ce type d'endoscope. Ce résultat doit par ailleurs être considéré comme une anomalie qui doit déclencher un processus de recherche des causes de la non-conformité sur l'ensemble de la chaîne de traitement des endoscopes ou sur une éventuelle défaillance ou un mésusage de l'ESET.

L'ensemble des résultats des prélèvements microbiologiques réguliers, ainsi que les levées de non-conformités sont consignés dans le système qualité du service d'endoscopie.

Requalification de l'ESET ⁽⁵⁾

Toute intervention ou opération effectuée sur l'ESET doit donner lieu à une évaluation documentée par le fabricant de son impact sur la performance de l'ESET.

De même, une qualification sera à programmer si stockage d'une nouvelle famille d'endoscope.

Si les performances de l'ESET sont modifiées, une requalification doit être systématiquement réalisée sur la durée de stockage préalablement validée sur au moins un exemplaire de chaque famille d'endoscopes et sur un nombre d'endoscopes correspondant à au moins un tiers de la capacité totale de l'enceinte.

Annexe 6 - Archivage

L'archivage des résultats microbiologiques d'analyses environnementales peut être effectué à plusieurs niveaux :

- obligatoirement par le laboratoire effectuant la prestation,
- l'EOH,
- le service concerné (exemple : service de traitement des endoscopes avec la traçabilité des endoscopes ou le service technique dans le carnet sanitaire des réseaux d'eau).

Une procédure doit être écrite pour définir le lieu d'archivage, la durée, la fréquence, la méthode, le support et les personnes autorisées à consulter les archives.

Les locaux d'archivage doivent :

- être sécurisés,
- protégés contre les dégâts des eaux et conformes à la législation concernant la protection incendie.

Pour l'archivage informatique :

- Les dossiers de suivi, conservés par un système informatique doivent être protégés contre toutes pertes ou altérations des données.
- Il faut, pendant la durée de l'archivage, pouvoir restituer les données rapidement et ce dans un format compatible et compréhensible.

Durée d'archivage :

- En dehors de la thérapie cellulaire où la durée d'archivage est de 10 ans, concernant le laboratoire, l'archivage des résultats microbiologiques d'analyses environnementales ne fait pas l'objet de critères précis quant à la durée de conservation dans la norme NF EN ISO/CEI 17025 (2005). Il est juste indiqué qu'elle doit être définie. Il incombe donc au laboratoire prestataire de spécifier ses modalités de conservation des résultats (papier ou informatique) et de s'assurer de la sûreté et de la confidentialité.
- Pour les analyses d'endoscopes, les critères de conservation sont de 5 ans pour les résultats microbiologiques au laboratoire et habituellement de 30 ans dans le « carnet de vie » des endoscopes^{(3) 85}.
- Les procédures et modes opératoires sont aussi conservés par le laboratoire 18 mois suivant le document « SH REF 02 » du Cofrac et 3 ans suivant le GBEA.
- Il n'y a pas d'obligations légales de conservation des résultats par l'EOH. Lorsque l'EOH et le laboratoire prestataire appartiennent au même établissement, ils peuvent envisager entre eux un endroit unique de conservation ou de stockage des données.
- En cas de contentieux pour les dossiers d'infections nosocomiales, il est intéressant de garder les contrôles d'environnement des blocs opératoires pendant au minimum 10 ans ou, au mieux, 20 ans. S'il n'y a pas d'obligation légale, apporter la preuve d'un bon fonctionnement des ventilations (du système de traitement d'air) est important pour argumenter que l'établissement avait mis en place toutes les mesures pour assurer la sécurité des patients

⁸⁵ - Arrêté interministériel du 11 mars 1968 : fixe les durées de conservation des dossiers médicaux et des archives médicales à 20 ans ;

- Article R. 1112-7 du code de santé publique (issu du décret n° 2002-637 du 29 avril 2002) : « Dans les établissements publics de santé et les établissements privés participant à l'exécution du service public hospitalier, les informations concernant la santé des patients sont conservées conformément à la réglementation relative aux archives publiques hospitalières ».

- L'article L. 1142-28 du code de santé publique (issu de la loi du 4 mars 2002) permet aux patients d'engager la responsabilité des professionnels de santé et des établissements de santé publics ou privés, à l'occasion d'actes de prévention, de diagnostic ou de soins pendant « dix ans à compter de la consolidation du dommage ». La désinfection des endoscopes peut être impliquée à l'occasion de tout litige mettant en cause la responsabilité de l'établissement ou des professionnels, notamment en cas d'infection nosocomiale. Il est donc recommandé de conserver les documents de traçabilité suffisamment longtemps pour en faire usage à l'occasion d'une procédure en responsabilité.

Annexe 7 - Autres techniques en microbiologie (liste non exhaustive)

ATP-métrie

Toute cellule vivante produit et consomme de l'ATP (adénosine triphosphate), c'est une molécule énergétique universelle qui n'est pas spécifique des bactéries ou micro-organisme et dont la concentration varie en fonction de l'état physiologique de la cellule.

L'ATP-métrie peut être appliquée pour la détection et la quantification d'une activité bactérienne totale, en laboratoire ou sur le terrain.

Le principe est de détecter l'ATP comme indicateur d'activité métabolique pour vérifier la présence de bactéries vivantes dans l'échantillon. Mis en présence de luciférine et de luciférase de luciole, l'ATP intervient dans l'étape d'activation du complexe luciférase-luciférine, dont l'oxydation est à l'origine d'une émission lumineuse. Le dosage de l'ATP repose donc sur la mesure de l'intensité de cette émission lumineuse. Les applications en microbiologie sont basées sur la lyse de ces cellules potentiellement contenues dans l'échantillon et la mesure de la quantité de lumière émise par le milieu contenant à l'origine la luciférine et l'enzyme luciférase.

La méthode caractérise la présence ou la non détection de micro-organismes (limite de détection). Elle ne permet pas l'identification des bactéries et il n'y a pas de corrélation directe entre quantité d'ATP et dénombrement bactérien.

Remarque : l'ATP-métrie est aussi une méthode complémentaire pour les surfaces car elle constitue une mesure de la salissure, mais il n'y a pas de corrélation entre l'ATP-métrie et les contrôles microbiologiques.

PCR : « polymérase chain reaction »

L'amplification en chaîne par polymérisation ou réaction en chaîne par polymérisation (PCR), est une méthode de biologie moléculaire d'amplification génique *in vitro*, qui permet d'obtenir, à partir d'un échantillon complexe et peu abondant d'importantes quantités d'un fragment d'ADN spécifique et de longueur définie. La sélectivité de la technique vient du fait que les amorces nucléotidiques utilisées sont spécifiques du gène à amplifier.

La PCR en temps réel (q-PCR ou Real-time PCR) est une évolution de la PCR classique qui consiste à mesurer la quantité d'ADN polymérisé à chaque cycle grâce à une sonde fluorescente ou un agent fluorescent intercalant de l'ADN. Elle permet ainsi de faire des mesures quantitatives (q-PCR) en comparant les niveaux de fluorescence à ceux d'un standard externe composé de solutions de concentration calibrée en unités génomes amplifiées (ex : *Legionella pneumophila*).

C'est une alternative en particulier pour la recherche de *Legionella* (norme NF T90-471- avril 2010 (N32)) mais, pour le moment, seule la technique par culture est reconnue par la réglementation (arrêté du 1^{er} février 2010) ⁽⁷²⁾.

Les résultats obtenus par cette méthode sont exprimés en nombre d'unités génome de *Legionella* spp. et *Legionella pneumophila* par litre d'eau (en UG/L). Les bactéries dénombrées sont celles contenant de l'ADN amplifiable, qu'elles soient intactes ou endommagées (non lysées). Cette méthode ne permet pas telle quelle de distinguer les cellules viables des cellules non viables (*a priori* non infectieuses) ou les cellules cultivables des non cultivables. De nouvelles approches permettraient de différencier viables/non viables (dégradation ou non amplification de l'ADN accessible).

Endotoxines

Les endotoxines sont les lipopolysaccharides (LPS) thermostables, présents de manière constitutive dans la membrane externe des bactéries à Gram négatif. Elles peuvent exercer des effets biologiques sur les patients même en l'absence de bactéries

Les endotoxines bactériennes peuvent être recherchées par la méthode au lysat d'amœbocytes de limule (LAL). Les cellules de l'hémolymph de d'un arthropode marin, le *Limulus polyphemus* ont la particularité de se gélifier en présence de quantité même très faible d'endotoxines. Dans toutes les versions de ce test (gel-caillot, turbidimétrie et chromogène), le point final (gel-caillot, turbidité ou couleur) apparaît d'autant plus vite que la concentration en endotoxines est élevée. La méthode est très sensible au pH (6,5 - 7,5) et à la température (37°C ± 1°C).

Des méthodes rapides sont également disponibles sur le marché.

Les prélèvements pour dosage d'endotoxines doivent être réalisés sur récipients stériles et apyrogènes, validés pour la recherche d'endotoxines (anti adsorption et anti relargage). La qualité des eaux pour dilution des concentrés de dialyse et pour préparation injectable est fixée par la Pharmacopée Européenne qui impose un taux d'endotoxine inférieur ou égal à 0,25 UE/mL (Unité Internationale d'Endotoxine). Pour la solution de substitution utilisée dans l'hémodiafiltration en ligne, le taux d'endotoxines doit être inférieur ou égal à 0,05 UE/mL.

Spectrométrie de masse MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation Time Of Flight Mass Spectrometry)

La spectrométrie de masse MALDI-TOF est une nouvelle technologie (*Désorption-ionisation laser assistée par matrice et temps de vol*) apparue ces dernières années en microbiologie qui permet d'identifier rapidement les micro-organismes. Les bactéries isolées à partir d'une culture (échantillon à analyser) sont mélangées à une « matrice » et déposées sur une lame. Les macromolécules, notamment les protéines, obtenues sont ionisées à l'aide d'un rayon laser pour leur permettre de traverser une colonne de vide. La durée de cette traversée, ou « temps de vol », dépend essentiellement de la masse de chaque protéine et est représentée par un pic. Chaque profil de pics obtenu (sorte de code barre) est caractéristique d'une espèce et la comparaison avec une banque de données incluant un grand nombre de bactéries enregistrées permet une identification précise du genre et de l'espèce en quelques minutes.

Annexe 8 - Les neutralisants de l'activité antibactérienne (liste non exhaustive)

Pour les dérivés halogénés (hypochlorite, chloramine, iodophores) dichlore, le diiode ou le dibrome et d'autres oxydants...

Thiosulfate de sodium

Pour information :

- la masse théorique de thiosulfate de sodium anhydre pour neutraliser 1 mg de chlore libre est de 7,1 mg,
- les valeurs recommandées en chlore libre sont de 0,1 à 0,3 mg par litre pour l'eau potable.

Pour les peroxydes

Catalase

Peroxydase

Pour information :

- 1 unité d'enzyme catalyse la décomposition de 1,4 mole de peroxyde d'hydrogène par minute à 25°C et pH 7

Pour les ammoniums quaternaires

Polysorbate 80 (Tween 80[®]) + lécithine

Polysorbate 80 (Tween 80[®]) + jaune d'œuf frais

Emulsion de phospholipides

Jaune d'œuf frais dilué à 5 %

Pour les produits contenant des métaux lourds

Thioglycolate de sodium

L cystéine

Remarque : Les composants d'un produit sont donnés dans sa fiche de données de sécurité et peuvent être communiqués par le fabricant qui peut fournir également à la demande les neutralisants utilisables pour ce produit.

Bibliographie

Bibliographie

1. **CTINILS, Ministère de la santé.** Surveillance microbiologique de l'environnement dans les établissements de santé. Air, eaux et surface. 2002. 78 pages.
2. **CCLin Sud-Ouest.** Contrôles microbiologiques en hygiène hospitalière. 1998. 30 pages.
3. **CTINILS.** Éléments d'assurance qualité en hygiène relatifs au contrôle microbiologique des endoscopes et à la traçabilité en endoscopie. 2007. 55 pages.
4. **CTINILS.** Guide pour l'utilisation des laveurs désinfecteurs d'endoscopes. 2003. 37 pages.
5. **HCSP.** Enceintes de stockage d'endoscopes thermosensibles (ESET). 2013. 14 pages.
6. **Aspec.** La Biocontamination – salle propres, environnements maîtrisés et zones de confinement. 2008. 266 pages .
7. **SF2H.** Qualité de l'air au bloc opératoire et autres secteurs interventionnels. *Hygiènes*. 2015. 64 pages.
8. **Meunier O, Hernandez C, Piroird M, Heilig R, Steinbach D, Freyd A.** Prélèvements bactériologiques des surfaces : importance de l'étape d'enrichissement et du choix des milieux de culture. *Annales de Biologie Clinique*. 2005, Vol. 63, pp. 481-486.
9. **SF2H, SFMM.** Risque infectieux fongique et travaux en établissement de santé. 2011. 56 pages.
10. **Ministère de l'emploi et de la solidarité, ministère délégué à la santé.** Bonnes pratiques de pharmacie hospitalière. 2001. 63 pages.
11. **AFS.** Maîtrise et contrôles d'environnement en stérilisation. 2005, p. 48 pages. 48 pages.
12. **AFSSPS.** Décision du 27 octobre 2010 définissant les règles de bonnes pratiques relatives à la préparation, à la conservation, au transport, à la distribution et à la cession des tissus, des cellules et des préparations de thérapie cellulaire. 2010. 50 pages.
13. **Ministère de la santé, de la jeunesse et des sports ; agence française de sécurité sanitaire des produits de santé.** Bonnes pratiques de préparation. *BO n° 2007/7bis*. 81 pages.
14. **Ministère de la santé.** L'eau dans les établissements de santé. Guide technique. 2005. 115 pages.
15. **Ougier-Diebolt M.** Les prélèvements microbiologiques des surfaces en milieu hospitalier : revue bibliographique, enquête de pratiques et étude de rendement. Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie, Bordeaux, 2013.
16. **Ministère des affaires sociales et de la sante.** Les Bonnes Pratiques de Fabrication des substances actives et des médicaments à usage humain (BPF partie I). *BO N° 2015/12 bis*. 318 pages.
17. **Anses.** Risques sanitaires liés aux piscines. Partie 1 : piscines réglementées. 2010. 242 pages. Addendum de mars 2012.
18. **Anses.** Risques sanitaires liés aux piscines. Partie 2 : bains à remous. 2013. 202 pages.
19. **Landers TF, Hoet A, Wittum TE.** Swab Type, Moistening, and Preenrichment for *Staphylococcus aureus* on Environmental Surfaces. *Journal of Clinical Microbiology*. 2010, Vol. 48, pp. 2235-2236.
20. **Moore G, Griffith C.** Problems associated with traditional hygiene swabbing: the need for in-house standardization. *Journal of Applied Microbiology*. 2007, Vol. 103, pp. 1090-1103.
21. **CCLIN Sud Est.** Les catégories d'eau dans les établissements de santé. Typologie - Traitements complémentaires - Référentiels. 2015. 17 pages.
22. **Landrin A, Bissery A, Kac G.** Monitoring air sampling in operating theatres : can particle counting replace microbiological sampling? *J Hosp Infect*. 2005, 61, pp. 27-29.
23. **Meunier O, Schwebel A, Meistermann C, Falcone F.** Evaluation des méthodes de prélèvement pour le contrôle microbiologique des textiles. *Annales de Biologie Clinique*. 2008, Vol. 66, pp. 183-188.
24. **HCSP.** Risque lié aux légionelles. Guide d'investigation et d'aide à la gestion. 2013. 83 pages.
25. **Cangneux JP et Col.** Surveillance mycologique de l'environnement pour la prévention de l'aspergillose invasive. Propositions de standardisation des méthodologies et des modalités d'application. *La Presse Médicale*. 2002, Vol. 31, 18. 841-848.

Remarque : Référence 10 : Les BPPH ont fait suite et remplacé la circulaire 672 d'octobre 1997 et peuvent être considérées comme « réglementaires » ; elles sont actuellement en cours de révision.

Textes réglementaires

Note d'information N° DGS/EA4/2015/118 du 13 avril 2015 relative aux conséquences de la modification de la norme NF T90-431 "Qualité de l'eau - Recherche et dénombrement de *Legionella spp.* et de *Legionella pneumophila* - Méthode par ensemencement direct et après concentration par filtration sur membrane ou centrifugation" (révision 2014).

Note d'information DGS/EA4/2014/167 du 23 mai 2014 relative à la diffusion du guide du Haut conseil de la santé publique (HCSP) pour l'investigation et l'aide à la gestion sur le risque lié aux légionelles

Circulaire DGS/EA4 n° 2010-448 du 21 décembre 2010 relative aux missions des Agences régionales de santé dans la mise en oeuvre de l'arrêté du 1er février 2010 relatif à la surveillance des légionelles dans les installations de production, de stockage et de distribution d'eau chaude sanitaire

Décision du 27 octobre 2010 définissant les règles de bonnes pratiques relatives à la préparation, à la conservation, au transport, à la distribution et à la cession des tissus, des cellules et des préparations de thérapie cellulaire.

Décret n° 2010-439 du 30 avril 2010 relatif à la commission médicale d'établissement dans les établissements publics de santé.

Arrêté du 1er février 2010 relatif à la surveillance des légionelles dans les installations de production, de stockage et de distribution d'eau chaude sanitaire.

Décret n° 2008-990 du 18 septembre 2008 relatif à la gestion de la qualité des eaux de baignade et des piscines.

Circulaire DGS/EA4 n° 2008-65 du 22 février 2008 relative aux dispositions réglementaires applicables aux piscines ouvertes au public, à l'utilisation des produits et procédés de traitement de l'eau et notamment à ceux mettant en oeuvre des lampes à rayonnement ultraviolet (UV) pour la déchloration des eaux.

Arrêté du 12 février 2007 relatif aux conditions auxquelles doivent satisfaire les laboratoires réalisant les prélèvements et les analyses de surveillance des eaux en application des articles R. 1321-24 et R. 1322-44 du code de la santé publique.

Circulaire DHOS/E4/AFSSAPS/DGS n° 2007-52 du 30 janvier 2007 relative aux spécifications techniques et à la sécurité sanitaire de la pratique de l'hémofiltration et de l'hémodiafiltration en ligne dans les établissements de santé.

Circulaire DGS/SD7A n° 2007-39 du 23 janvier 2007 relative à la mise en oeuvre des arrêtés du 11 janvier 2007 concernant les eaux destinées à la consommation humaine.

Arrêté du 11 janvier 2007 relatif aux limites et références de qualité des eaux brutes et des eaux destinées à la consommation humaine mentionnées aux articles R. 1321-2, R. 1321-3, R. 1321-7 et R. 1321-38 du code de la santé publique. Modifié par : *Arrêté du 21 janvier 2010 modifiant l'arrêté du 11 janvier 2007 relatif au programme de prélèvements et d'analyses du contrôle sanitaire pour les eaux fournies par un réseau de distribution, pris en application des articles R.1321-10, R.1321-15 et R.1321-16 du code de la santé publique.*

Arrêté du 21 janvier 2010 modifiant l'arrêté du 11 janvier 2007 relatif au programme de prélèvements et d'analyses du contrôle sanitaire pour les eaux fournies par un réseau de distribution, pris en application des articles R.1321-10, R.1321-15 et R.1321-16 du code de la santé publique.

Circulaire DGS/SD5C/SD7A/DESUS n° 2005-323 du 11 juillet 2005 relative à la diffusion du guide d'investigation et d'aide à la gestion d'un ou plusieurs cas de légionellose.

Arrêté du 24 janvier 2005 relatif aux conditions d'agrément des laboratoires pour la réalisation des prélèvements et des analyses du contrôle sanitaire des eaux.

Circulaire DGS/SD7A/SD5C-DHOS/E4 2002-243 du 22 avril 2002 relative à la prévention du risque lié aux légionelles dans les établissements de santé.

Circulaire DGS/DH/AFSSAPS n°2000-337 du 20 juin 2000 relative à la diffusion d'un guide pour la production d'eau pour l'hémodialyse des patients insuffisants rénaux.

Circulaire DGS/DH/AFSSAPS n°311 du 7 juin 2000 relative aux spécifications techniques et à la sécurité sanitaire de la pratique de l'hémofiltration et de l'hémodiafiltration en ligne dans les établissements de santé.

Circulaire DGS/VS2-DH/EM1/EQ1 n° 97-672 du 20 octobre 1997 relative à la stérilisation des dispositifs médicaux dans les établissements de santé. (BPPH - 2001⁽¹⁰⁾)

Arrêté du 29 septembre 1997 fixant les conditions d'hygiène applicables dans les établissements de restauration collective à caractère social. *Abrogé par l'arrêté du 21 décembre 2009 en ce qui concerne les produits d'origine animale et les denrées alimentaires en contenant.*

Circulaire DGS/VS2 n° 97/311 du 24 avril 1997 relative à la surveillance et à la prévention de la légionellose. Guide d'investigation d'un ou plusieurs cas de légionellose.

Circulaire DGS/PGE/1D 2058 du 30 décembre 1986 relative à l'utilisation des fontaines réfrigérantes

Normes

Rappel : les normes, éditées en France par l'AFNOR (association française de normalisation), sont de la forme : **NF « titre »** quand elles sont françaises, **NF EN « titre »** quand elles sont européennes, **NF ISO « titre »** quand elles sont internationales et **NF EN ISO « titre »** quand les normes internationales sont reprises dans la collection européenne.

NF EN ISO 14644-1 (2016) - Salles propres et environnements maîtrisés apparentés - Partie 1 : classification de la propreté de l'air.

NF EN ISO 14644-2 (2016) - Salles propres et environnements maîtrisés apparentés - Partie 2 : surveillance du maintien des performances de la salle propre pour la propreté particulière de l'air

FD T90-520 (2005) - Qualité de l'eau - Guide technique de prélèvement pour le suivi sanitaire des eaux en application du code de la santé publique.

FD T90-522 (2006) - Qualité de l'eau - Guide technique de prélèvement pour la recherche de *Legionella* dans les eaux.

ISO 21501-4:2007 Mai 2007 - Détermination de la distribution granulométrique - Méthodes d'interaction lumineuse de particules uniques - Partie 4 : compteur de particules en suspension dans l'air en lumière dispersée pour espaces propres.

NF EN 12469 (2000) - Biotechnologie - Critères de performance pour les postes de sécurité microbiologique

NF EN 14065 (2003) - Textiles - Textiles traités en blanchisserie - Système de maîtrise de la biocontamination.

NF EN 16266 (2008) - Qualité de l'eau. — Détection et dénombrement de *Pseudomonas aeruginosa* par filtration sur membrane.

NF EN 16442 (2015) - Enceinte de stockage à atmosphère contrôlée pour endoscopes thermosensibles traités

NF EN 26461-2 (1993) - Qualité de l'eau - Recherche et dénombrement des spores de micro-organismes anaérobies sulfito-réducteurs (*Clostridia*) - Partie 2 : méthode par filtration sur membrane.

NF EN 61010-1 (Janvier 2011) Règles de sécurité pour appareils électriques de mesurage, de régulation et de laboratoire - Partie 1 : exigences générales

NF EN ISO 14644-3 (2006) - Salles propres et environnements maîtrisés apparentés - Partie 3 : méthodes d'essai

NF EN ISO 14698-1 (2004) - Salles propres et environnements maîtrisés apparentés - Maîtrise de la biocontamination - Partie 1 : principes généraux et méthodes.

NF EN ISO 14698-2 (2004) - Salles propres et environnements maîtrisés apparentés - Maîtrise de la biocontamination - Partie 2 : évaluation et interprétation des données de biocontamination.

NF EN ISO 15189 (2012) Laboratoires de biologie médicale - Exigences concernant la qualité et la compétence - Laboratoires d'analyses de biologie médicale.

NF EN ISO 19011 (2011) Lignes directrices pour l'audit des systèmes de management.

NF EN ISO 19458 (2006) - Qualité de l'eau - Échantillonnage pour analyse microbiologique.

NF EN ISO 19458 Novembre (2006) - Qualité de l'eau - Échantillonnage pour analyse microbiologique.

NF EN ISO 5667-1 (2007) - Qualité de l'eau - Échantillonnage - Partie 1 : lignes directrices pour la conception des programmes et des techniques d'échantillonnage.

NF EN ISO 5667-3 (2013) - Qualité de l'eau - Échantillonnage - Partie 3 : conservation et manipulation des échantillons d'eau.

NF EN ISO 6222 (1999) - Qualité de l'eau - Dénombrement des micro-organismes revivifiables - Comptage des colonies par ensemencement dans un milieu de culture nutritif gélosé.

NF EN ISO 7899-2 (2000) - Qualité de l'eau - Recherche et dénombrement des entérocoques intestinaux - Partie 2 : méthode par filtration sur membrane.

NF EN ISO 8199 (2008) - Qualité de l'eau - Lignes directrices générales pour le dénombrement des micro-organismes sur milieu de culture.

NF EN ISO 9000 (2005) Systèmes de management de la qualité - Principes essentiels et vocabulaire.

NF EN ISO 9001 (2008) Systèmes de management de la qualité - Exigences

NF EN ISO 9004 (2009) Gestion des performances durables d'un organisme- Approches de management par la qualité.

NF EN ISO 9308-1 (2000) - Qualité de l'eau - Recherche et dénombrement des *Escherichia coli* et des bactéries coliformes - Partie 1 : méthode par filtration sur membrane.

NF EN ISO/CEI 17025 (2005) Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais.

NF ISO 18593 (2004) - Microbiologie des aliments - Méthodes horizontales pour les techniques de prélèvement sur des surfaces, au moyen de boîtes de contact et d'écouvillons.

NF S90-351 (2013) - Établissements de santé - Zones à environnement maîtrisé - Exigences relatives à la maîtrise de la contamination aéroportée

NF S93-315 (2008) - Fluides pour hémodialyse - Exigences et recommandations aux utilisateurs

NF S98-030 (2012) - Enceintes de stockage des endoscopes thermosensibles. Abrogée par la norme européenne NF EN 16442

NF T90-431 (Novembre 2014) - Qualité de l'eau - Recherche et dénombrement de *Legionella spp* et de *Legionella pneumophila* - Méthode par ensemencement direct et après concentration par filtration sur membrane ou centrifugation.

NF T90-471 (2010) - Qualité de l'eau - Détection et quantification des *Legionella* et/ou *Legionella pneumophila* par concentration et amplification génique par réaction de polymérisation en chaîne en temps réel (RT - PCR).

XP T90-412 (2006) - Qualité de l'eau - Recherche et dénombrement des staphylocoques pathogènes - Méthode par filtration sur membrane.

Documents « Cofrac »

Le COFRAC (<http://www.cofrac.fr>) propose différents guides techniques complémentaires de la norme NF EN ISO 17025, qui sont d'ordre général ou spécifiques :

- LAB REF 02 - Exigences pour l'accréditation des laboratoires selon la norme NF EN ISO/CEI 17025.
- LAB GTA 23 - Guide Technique d'Accréditation - Analyses microbiologiques, biologiques et de biologie moléculaire des eaux.
- LAB GTA 19 - Guide Technique d'Accréditation en Microbiologie appliquée à la chimie fine et produits cosmétiques, d'hygiène et de santé.
- LAB GTA 29 - Guide Technique d'accréditation - Echantillonnages d'eau et essais physico-chimiques des eaux sur site.
- LAB-REF-05 - Règlement d'accréditation.

Sites internet (novembre 2015)

<http://nosobase.chu-lyon.fr>

<http://www.cofrac.fr>

<http://www.iso.org/iso/fr/home/standards.htm>

<http://www.boutique.afnor.org/normes-produits-edition>

<http://ansm.sante.fr/Mediatheque/Publications/Pharmacopee-francaise-Plan-Preambule-index>

<http://www.sf2h.net>

<http://www.cclin-arlin.fr>

<http://www.edqm.eu/fr/accueil-DEQM-628.html> (Pharmacopée Européenne)

<http://legifrance.gouv.fr/affichCode.do?cidTexte=LEGITEXT000006072665>(Code de la santé publique)