



Fiche-outil pour un guide des bonnes pratiques d'hygiène

TECHNIQUES

Suivi de la réalisation et de l'efficacité des opérations de nettoyage et désinfection des surfaces, des matériels et des locaux

Cette fiche ne prétend pas être exhaustive. Elle vise à enrichir (et non limiter) la réflexion des professionnels sur le sujet du suivi de la réalisation et de l'efficacité des opérations de nettoyage et désinfection des surfaces, des matériels et des locaux.

Introduction

Conformément aux dispositions du Paquet Hygiène, les professionnels de l'agroalimentaire sont vivement encouragés à rédiger des Guides de bonnes pratiques d'hygiène et d'application des principes HACCP (GBPH). Le règlement (CE) n° 852/2004¹ prescrit l'obligation de prendre des mesures adéquates pour nettoyer, et au besoin désinfecter les équipements, les locaux, les caisses, les conteneurs, les surfaces ou les dispositifs en contact avec les denrées alimentaires, les véhicules de transport ou les navires. Ces prescriptions sont reprises dans le règlement (CE) n° 853/2004² qui détaille les exigences spécifiques par secteur d'activité agro-alimentaire.

Les opérations de nettoyage et désinfection, qu'elles soient réalisées simultanément ou l'une après l'autre, font, par conséquent, partie de programmes pré-établis (et prérequis) permettant d'assurer le maintien d'un bon environnement hygiénique de production, d'entreposage et/ou de transport. À ce titre, elles doivent être précisément décrites dans le plan de maîtrise sanitaire de l'entreprise. En production, les bonnes pratiques d'hygiène impliquent la nécessaire vérification de la réalisation et de l'efficacité de ces opérations. Pour cela, les professionnels de l'agroalimentaire utilisent dans la plupart des cas des méthodes d'analyses permettant de vérifier le bon déroulement des opérations de nettoyage et désinfection sur les surfaces. Plusieurs objectifs peuvent être assignés aux analyses de surface, les stratégies de prélèvements différeront selon l'objectif choisi. Le présent document se limite à décrire les prélèvements réalisés après nettoyage et désinfection; par exemple juste avant le début de la production afin notamment d'en montrer les avantages et les limites. Cette fiche prend en compte la situation générale dans les entreprises agro-alimentaires et implique une nécessaire adaptation de la part des professionnels et/ou des filières.

Cette fiche se veut un outil pour les rédacteurs des GBPH en décrivant les principales méthodes utilisées ainsi que des éléments de stratégie aptes à l'élaboration, la réalisation et le suivi de l'efficacité des opérations de nettoyage et désinfection.

¹ Règlement (CE) n° 852/2004 du Parlement européen et du Conseil du 29 avril 2004 relatif à l'hygiène des denrées alimentaires (annexe I, partie A, chapitre II, point 4a, pour la production primaire; et annexe II, chapitre I, II, III, IV, V, pour tous les exploitants du secteur alimentaire hors production primaire).

² Règlement (CE) n° 853/2004 du Parlement européen et du Conseil du 29 avril 2004 fixant des règles spécifiques d'hygiène applicables aux denrées alimentaires d'origine animale (annexe III).

Éléments de stratégie d'analyse de la qualité hygiénique des surfaces

Il est important pour le professionnel de définir une stratégie de prélèvement et d'analyse, appliquée avec strictement les mêmes méthodes standardisées, afin que le suivi dans le temps soit fait avec des résultats comparables.

Ces méthodes visent à :

- > détecter/quantifier des molécules indicatrices de souillures. L'utilisation de ces méthodes permet le plus souvent de valider une opération de nettoyage;
- > détecter/quantifier les micro-organismes présents sur les surfaces par empreinte sur gélose ou par frottis. L'utilisation de ces méthodes permet généralement de valider une opération de désinfection.

Choix de la méthode de prélèvement

Le choix de la méthode sera fonction :

- > de l'accessibilité et de la taille de la surface à échantillonner,
- > des micro-organismes recherchés (un seul ou plusieurs micro-organismes à partir du même prélèvement) et de leur distribution. Ainsi, il est utopique d'espérer détecter une contamination en *Listeria monocytogenes* ou *Salmonella* en réalisant un prélèvement par empreinte. Pour ces micro-organismes, il faut échantillonner une grande superficie.

Choix des lieux de prélèvement

Les prélèvements sont effectués préférentiellement dans les zones où l'hygiène du produit pourrait être affectée (tapis convoyeur ou trancheur...) et/ou sur des surfaces difficiles à nettoyer. Cependant, les zones où l'aliment est moins sensible aux contaminations ne doivent pas être oubliées dans l'échantillonnage mais à une fréquence moindre.

Choix des micro-organismes recherchés

Afin de suivre l'efficacité des opérations de nettoyage et désinfection il est important de choisir des micro-organismes systématiquement présents sur les surfaces et de préférence représentatifs de l'activité. En pratique, plusieurs groupes de micro-organismes sont utilisés par les opérateurs :

- > la flore aérobique mésophile (FAM, nommée aussi flore totale) permet d'apprécier le niveau global de contamination de la surface échantillonnée et ainsi la qualité des opérations de nettoyage et désinfection. Les géloses de dénombrement utilisées pour la flore aérobique mésophile sont classiquement incubées à +30°C pendant 48 à 72h, mais il est important de retenir que la durée et la température d'incubation doivent être adaptées à la filière et aux micro-organismes recherchés ;
- > les entérobactéries, dans certaines filières, peuvent être un bon indicateur de l'hygiène générale de l'entreprise mais ne constituent pas pour autant un indicateur de la présence ou de l'absence de micro-organismes pathogènes ;
- > en fonction des filières, d'autres micro-organismes peuvent être recherchés (*Pseudomonas*/filières viandes de boucherie et volailles ; levures-moisissures/produits secs ; *Staphylococcus aureus*/filières volailles et laitière ; etc.).

Fréquences des prélèvements et des analyses

Les analyses sont utilisées pour s'assurer de l'absence de dérive au cours du temps de l'efficacité des opérations d'hygiène. Leur fréquence tient donc compte du type d'activité, du volume de production, de la surface à échantillonner (tapis convoyeur ou trancheur versus cloison de chambre froide), du type d'aliment et de sa destination. La fréquence pourra être allégée lorsque les résultats sont satisfaisants ou augmentée lors de la mise en place d'une procédure et/ou en cas de mauvais résultats.

Interprétation et suivi des résultats

Il est important de souligner que les résultats obtenus sont exploitables s'ils font l'objet d'un enregistrement chronologique pour être interprétés de manière globale, plutôt en termes de tendance (à l'amélioration, à la stabilité ou à la dégradation). On pourra pour cela faire appel à des cartes de contrôles cumulatives présentant les résultats sous forme graphique par rapport à des objectifs ou niveaux-cibles. Ces niveaux-cibles sont fixés par l'exploitant sur la base de l'historique de ses données ou de critères réglementaires d'hygiène, s'ils existent. Leur dépassement révèle une perte de maîtrise et doit par conséquent conduire à la mise en œuvre d'actions correctives pré-établies.

Les méthodes de détection/quantification à utiliser pour le suivi

Méthodes indirectes d'évaluation de la qualité hygiénique des surfaces

ATP-métrie

L'ATP-métrie consiste à doser, grâce au système luciférine/luciférase, l'ATP (ou adénosine-triphosphate) qui est présente dans toute cellule vivante. L'ATP présent sur les surfaces peut être dosé. Les appareils utilisés sur le terrain permettent, en moins d'une minute, de connaître la quantité de résidus organiques (souillures alimentaires et microbiennes) présente sur

la surface et de mettre en œuvre une action corrective immédiate lorsque cette quantité dépasse la limite fixée. **L'ATP-métrie ne doit donc être utilisée que pour le contrôle de l'efficacité du nettoyage** et ne peut être utilisée pour la validation d'une désinfection.

Quantification des protéines et des sucres

D'autres indicateurs de souillures que l'ATP peuvent également être utilisés pour le contrôle de l'efficacité du nettoyage, c'est le cas des protéines et des sucres réducteurs (glucose, lactose). Ces souillures peuvent favoriser le développement microbien. Par ailleurs, la présence de protéines sur une surface peut réduire l'efficacité des désinfectants. Des tests rapides et simples d'utilisation, détectent la présence de résidus protéiques ou de sucres réducteurs indiquant ainsi le niveau de propreté « organique » des surfaces. Ils ne détectent pas une contamination microbienne et **il ne s'agit en aucun cas d'un contrôle spécifique de l'efficacité des opérations de désinfection**. Ces tests, basés sur des réactions colorimétriques, sont choisis en fonction du type de contamination organique. Ainsi, par exemple, l'industrie laitière, la filière fruits ou celle des boissons sucrées auront recours aux tests « sucre ».

Les différents principes de prélèvement mis en œuvre

Méthodes par empreinte

Il s'agit de réaliser une empreinte de la contamination par utilisation d'un dispositif permettant d'appliquer une gélose sur la surface à analyser. Il existe plusieurs méthodes de prélèvement :

- > les boîtes de gélose de contact (dites aussi boîtes de Rozier-Pantaléon) ;
- > les lames gélosées ;
- > et les films enduits de gélose.

L'utilisation de boîtes de gélose de contact est recommandée par la direction générale de l'alimentation (DGAL) pour vérifier l'efficacité des opérations d'hygiène du matériel en abattoir et en atelier de découpe d'animaux de boucherie et de volailles. La norme internationale ISO 18593 préconise « un temps de contact de dix secondes et une pression telle que celle exercée par une masse de 500 g ». Des applicateurs permettant de standardiser la pression et la durée d'application sont disponibles dans le commerce. Dans les géloses utilisées pour réaliser des empreintes, un colorant est parfois additionné et peut inhiber la croissance d'une partie des bactéries endommagées par les produits d'hygiène. Le prélèvement se fait de préférence sur une surface sèche.

Méthodes par frottis

Le principe des méthodes dites par frottis est basé sur le décrochement des microorganismes par frottement de la surface, dans deux directions perpendiculaires, avec un objet frottant qui va récupérer les bactéries détachées de la surface échantillonnée. Les objets frottants sont :

- > l'écouvillon, qui est à réserver aux prélèvements de petites surfaces (25 ou 100 cm² mesurés à l'aide d'un gabarit stérile) et aux zones difficiles d'accès. L'efficacité de ce frottis peut varier en fonction de la gestuelle et de la technique du préleveur, il est donc nécessaire d'en tenir compte pour établir les protocoles de prélèvements ;
- > l'utilisation d'éponges ou de chiffonnettes, qui permet d'échantillonner de grandes superficies (jusqu'à plusieurs m²) comme par exemple l'ensemble d'un tapis convoyeur, ce qui est classiquement fait pour rechercher des micro-organismes pathogènes comme *Listeria*

monocytogenes ou *Salmonella* dont la répartition est très hétérogène. En outre, le frottis par éponges ou chiffonnettes peut être réalisé plus vigoureusement qu'avec un écouvillon et il peut être réalisé sur des supports de dimensions ou de géométries variées.

L'objet frottant est ensuite placé dans un diluant permettant la remise en suspension des micro-organismes qui seront détectés/quantifiés classiquement par culture. L'utilisation des méthodes par frottis permet la recherche et le dénombrement de nombreux micro-organismes différents à partir d'un seul et même prélèvement.

Quantification/détection des micro-organismes par culture

Cultures

Il est généralement admis que les micro-organismes détachés sont stressés, **il convient donc de se mettre dans les meilleures conditions pour leur croissance**. Ainsi, on évitera l'utilisation du tampon phosphate comme diluant et on préférera un ensemencement des géloses en surface à un ensemencement dans la masse. On préférera la gélose tryptone soja à la gélose « plate count agar » **et on n'hésitera pas à prolonger de plusieurs jours les durées d'incubation** en veillant à l'absence de dessiccation des géloses. Le recours à des méthodes non culturales est possible.

De plus, il est nécessaire de neutraliser d'éventuels résidus de désinfectant lors du prélèvement. Ces derniers pourraient affecter la capacité des micro-organismes à se multiplier et donc le résultat obtenu par des méthodes culturales. Il est recommandé d'incorporer un neutralisant aux géloses utilisées pour faire les empreintes et d'humidifier les objets frottants par une solution neutralisante. On peut utiliser un neutralisant spécifique du principe actif du désinfectant ou un neutralisant polyvalent comme celui recommandé dans la norme ISO 18593.

Efficacité des méthodes de quantification des micro-organismes des surfaces

Il est important de garder à l'esprit que les empreintes et les frottis ne détachent qu'une partie des micro-organismes présents. En réalisant une série de prélèvements avec à chaque fois un nouvel objet frottant stérile au même endroit, le rendement de décrochage peut être amélioré. Donc, quelle que soit la méthode utilisée celle-ci sous-estimera systématiquement la contamination. **Il est donc important d'utiliser toujours la même** afin d'obtenir des résultats comparables. Lorsqu'il est décidé de changer de méthode, il faut que l'ancienne et la nouvelle soient appliquées simultanément pendant une durée permettant de collecter suffisamment de données pour établir des correspondances entre les deux méthodes.

Tableau de synthèse

Méthode	Exemple	Taille des surfaces échantillonnées	Limites de la méthode/points sensibles	Avantages de la méthode
Indirecte				
<ul style="list-style-type: none"> ● Décrocher les substances par frottement des surfaces à échantillonner. ● Mise en contact avec le réactif colorimétrique, ● Révéler la présence des molécules recherchées 	ATP-métrie protéines/sucres		<ul style="list-style-type: none"> ● N'évalue pas de manière spécifique l'efficacité de la désinfection ● Uniquement qualitatif 	<ul style="list-style-type: none"> ● Détection rapide
Par empreinte/contact				
<ul style="list-style-type: none"> ● Appliquer directement une gélose sur une surface à échantillonner. ● Incuber les géloses 24 à 72h* ● Compter les colonies microbiennes 	Gélose de contact	20 cm ²	<ul style="list-style-type: none"> ● Echantillonnage sur surfaces sèches, ● sous-estimation de la contamination microbienne par le faible décrochage microbien lors du prélèvement, ● certains milieux gélosés sélectifs ne permettent pas la reprise de croissance de tous les micro-organismes présents sur le prélèvement. 	<ul style="list-style-type: none"> ● La présence de laboratoire n'est pas indispensable, ● Peu de manipulation, ● Prélèvement rapide.
	Lame de gélose	10 cm ²		
	Film de gélose déshydratée	20 cm ²		
Par frottis				
<ul style="list-style-type: none"> ● Décrocher les micro-organismes par frottement des surfaces à échantillonner. ● Suspendre et diluer le prélèvement, ● Etaler sur gélose, ● Incuber les géloses 24 à 72h*, ● Compter les colonies microbiennes 	Ecouvillons	25 à 100 cm ²	<ul style="list-style-type: none"> ● Le décrochage par frottement des contaminants est très variable et est une source importante de la variabilité de la quantification 	<ul style="list-style-type: none"> ● Détection et quantification de différents microorganismes à partir d'un seul prélèvement, ● Prélèvements de surfaces variées, ● Echantillonnage de zones petites ou difficiles d'accès ● Possibilité de quantifier plus précisément par réalisation de dilutions
	Chiffonnettes	100 cm ² à plusieurs m ²		

* La durée de l'incubation peut être prolongée plusieurs jours en veillant à l'absence de dessiccation des géloses