

# Validation des procédures de nettoyage et désinfection

Christine FAILLE<sup>(1)</sup>, Jean-Baptiste LAMOUR<sup>(2)</sup>, Martine CLARISSE<sup>(1)</sup>, Nicolas ROSSI<sup>(3)</sup>, Magali HANNEQUIN<sup>(2)</sup>, Christine CHENE<sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup>INRA, UR638, Processus aux Interfaces et Hygiène des Matériaux, Villeneuve d'Ascq

<sup>(2)</sup>ADRIANOR, CRT, Tilloy-les-Mofflaines (3) ACTALIA, CRT, Villers Bocage

Une enquête réalisée auprès d'industriels de l'agroalimentaire montre que la grande majorité reste fidèle aux méthodes classiques d'analyse des surfaces par contact (lames bifaces, boîtes contact gélosées) pour vérifier l'efficacité de leurs procédures de nettoyage et désinfection. Pourtant, de nombreuses autres méthodes d'évaluation de l'état hygiénique des surfaces sont commercialisées. Parmi celles-ci, plusieurs techniques de contrôle microbiologiques et/ou biochimiques ont été étudiées sur 2 biofilms disposés sur 6 matériaux fréquemment utilisés en IAA. Il s'avère que le matériau et la souche ont une influence sur les résultats. Lors de cette étude, les tests biochimiques ont prouvé leur intérêt via leur capacité de détection des biofilms et leur rapidité de réponse. Ils peuvent jouer un rôle prépondérant dans la maîtrise de l'hygiène des surfaces en permettant une réaction immédiate par des actions correctives sur les opérations de nettoyage et désinfection.

**Mots clés :** Surfaces, biofilm, procédure de nettoyage-désinfection, tests rapides, évaluation de l'hygiène

## ABSTRACT

A survey of food manufacturers has shown that the vast majority still use traditional methods of surface analysis by contact (slides, contact plates) to monitor the efficacy of hygiene procedures. However, the main disadvantage of microbial methods is their long response time. Elsewhere, many biochemical methods for monitoring surface hygiene are now commercially available, but only patchy data are available on their efficiency to detect surface contamination. These methods will provide rapid responses, but are suspected to be poorly sensitive.

The purpose of this work was to compare the relevance of commercial microbiological and biochemical tests to assess surface hygiene, through detection of biofilms. The presence of biofilms from 2 strains on six materials often used in the food industries was investigated using different devices. Among the microbial tests, the percentage of biofilm detachment using contact devices was clearly affected by the substratum. Concerning tests involving a detachment step before enumeration, sponge, Quantiswabs®, Enviroswabs 3M™ and wipes were very efficient to detect biofilms, at least on smooth materials. In addition some biochemical tests could easily detect biofilms, e.g. Rida Check, Clean trace Plus and Clean Test for protein detection, and Speed Check for NADPH detection.

In conclusion, some biochemical rapid tests could be performed to assess the efficiency of surface cleaning procedures without laboratory facilities and with minimal training. Moreover, they would allow quick response as new cleaning step if required. In parallel, microbiological tests, despite their long response time, will allow the detection of viable and culturable adherent bacteria.

**Keywords:** surfaces, biofilm, cleaning and disinfection procedure, rapid tests, hygiene assessment

## CONTEXTE ET OBJECTIF

Dans les industries agroalimentaires (IAA), l'opération de Nettoyage & Désinfection (N&D) fait partie des bonnes pratiques d'hygiène exigées par la réglementation européenne (Règlement CE n°852/2004). Elle permet de maîtriser au moins partiellement les post-contaminations liées à la présence de bactéries adhérentes sur les surfaces (Figure 1). Cela dit, les surfaces des équipements des chaînes de transformation des aliments continuent à jouer un rôle majeur dans les contaminations des produits : la contamination de surfaces d'équipements serait responsable de 62% des empoisonnements en restauration collective en France (Données TIAC 2010). Il est donc indispensable de vérifier l'efficacité des procédures d'hygiène, comme le préconisent des normes d'application volontaire (ISO 22 000) et des référentiels privés (IFS, BRC). La plupart des tests commerciaux utilisés dans les IAA pour valider les procédures d'hygiène reposent sur la détection de microorganismes adhérents après une étape de croissance sur un milieu de laboratoire,

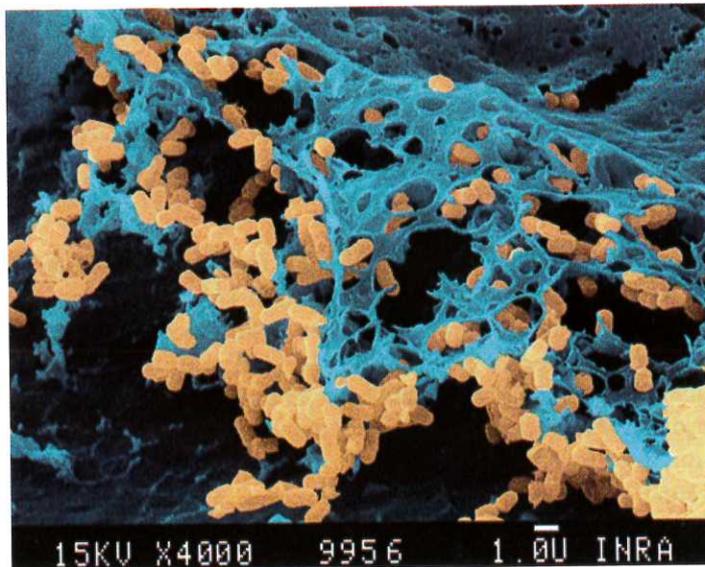


FIGURE 1 : BIOFILM OBSERVÉ EN MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE À BALAYAGE (ORANGE : BACTÉRIES, BLEU : COUCHE MUQUEUSE)

et permettent donc essentiellement de valider les procédures de désinfection. Pourtant, ces tests « microbiologiques » ne permettent pas la croissance de nombreux microorganismes « endommagés » par les procédures d'hygiène (jusqu'à 99,9% de la population microbienne [Zaklikowski, mémoire de master, Université de Virginie, 2006]). Or, dans certaines conditions, ces microorganismes endommagés pourront se multiplier, voire produire des toxines et représentent un réel problème au niveau sanitaire. Des tests biochimiques beaucoup plus rapides sont aussi commercialisés, et leur principe repose sur la détection de molécules (protéines, sucres, ATP, NADP...) provenant de résidus alimentaires ou de microorganismes cultivables ou non, voire morts. Malgré la diversité des tests commercialement disponibles, leur utilisation reste très limitée dans les IAA, ce qui peut s'expliquer par des arguments commerciaux parfois difficiles à traduire en termes de performance concrète. Dans le cadre d'un programme subventionné par la DRAAF Nord-Pas de Calais, le laboratoire PIHM de l'INRA (<http://www.lille.inra.fr/Le-centre-Les-recherches/Les-unites-du-centre/PIHM>) et l'ADRIANOR, Centre de Ressources Technologiques (<http://www.adrianor.com>) ont collaboré pour recenser puis évaluer les performances des différents dispositifs commercialisés. Une enquête a aussi été réalisée auprès d'industriels afin de connaître leurs pratiques d'autocontrôle des procédures de N&D.

## APPROCHE EXPERIMENTALE

### 1. Enquête auprès des industriels

Un état des lieux des pratiques d'autocontrôle des opérations de N&D a été effectué grâce à une enquête réalisée auprès de 26 entreprises agroalimentaires de la région Nord-Pas de Calais (effectif compris entre 10 et 210 salariés) de la plupart des secteurs d'activité des IAA (Figure 2). 43% des entreprises sont certifiées, essentiellement IFS.

### 2. Tests de contrôle de l'hygiène des surfaces

#### a. Les techniques d'autocontrôles des procédures de N&D

Parmi les méthodes microbiologiques, nous avons sélectionné des techniques de prélèvement par frottis suivies d'un dénombrement en laboratoire (Figure 3) et des méthodes de détection par empreinte (Figure 4). Les méthodes biochimiques testées sont présentées dans la figure 5.

#### b. Les souillures microbiennes

Le choix des microorganismes s'est porté sur deux bactéries capables de former des biofilms (bactéries intégrées dans des substances polymères extracellulaires ancrées sur une surface) : *Pseudomonas fluorescens* D3-276, isolée d'un environnement laitier, *Escherichia coli* CECT 434, isolée d'un cas clinique.

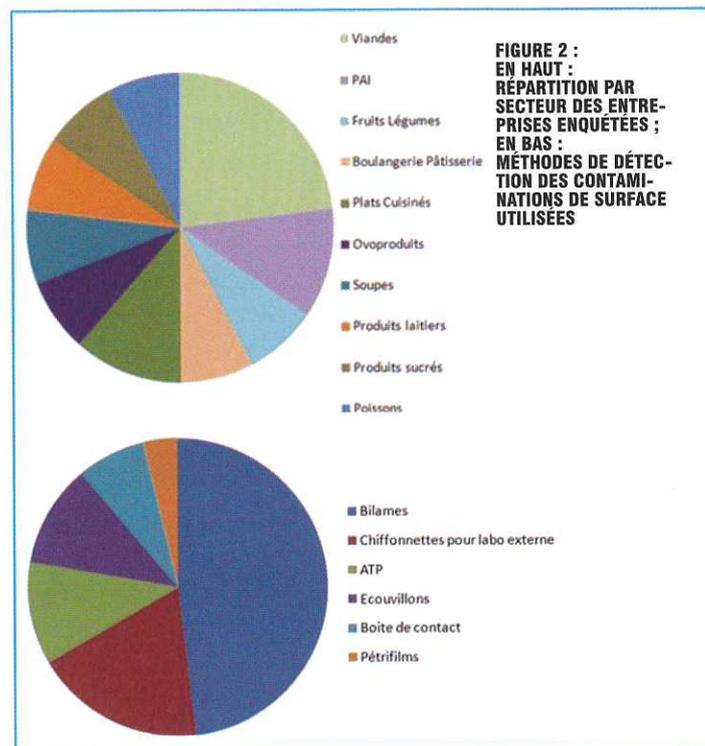


FIGURE 2 : EN HAUT : RÉPARTITION PAR SECTEUR DES ENTREPRISES ENQUÊTÉES ; EN BAS : MÉTHODES DE DÉTECTION DES CONTAMINATIONS DE SURFACE UTILISÉES

#### c. Les matériaux récepteurs

Les propriétés de surface des matériaux récepteurs affectent le décrochement et donc la sensibilité de détection des souillures adhérentes. Nous avons testé des matériaux potentiellement rencontrés dans les IAA et caractérisés par différentes propriétés de surface (Tableau 1) : aciers inoxydables glacé 2B et

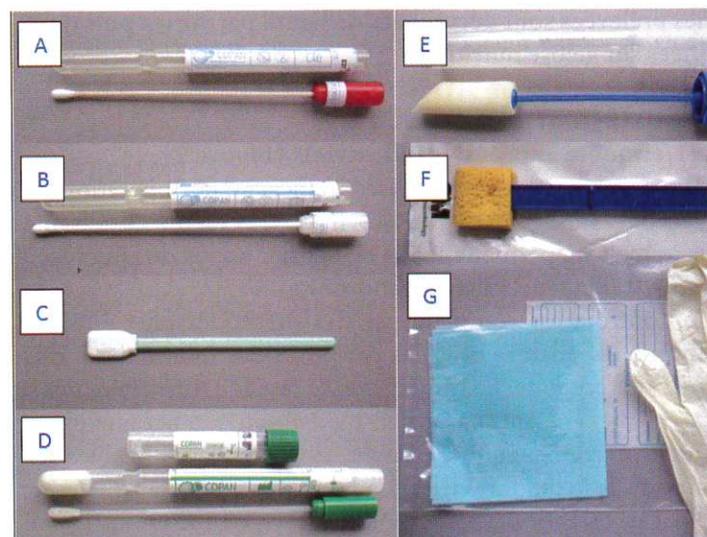


FIGURE 3 : OUTILS DE PRÉLÈVEMENT PAR FROTTIS. A : COTON (COPAN) ; B : RAYONNE (COPAN) ; C : FIBRE DE POLYESTER (TEXWIPE) ; D : NYLON FLOQUÉ (QUANTISWAB, COPAN) ; E : MOUSSE POLYESTER BISEAUTÉE (ENVIRO SWAB, 3M) ; F : ÉPONGE (SPONGE STICK, 3M) ; G : CHIFFONNETTE (GROSSERON)

	Verre	Acier inoxydable 2R	Acier inoxydable 2B	Polypropylène	Téflon	Polyéthylène
Rugosité moyenne Ra ( $\mu\text{m}$ )	< 0,01	0,02	0,13	0,14	0,45	11,61
Angle de contact à l'eau	25,5	43,0	50,3	97,1	113,0	98,0

TABLEAU 1 : PROPRIÉTÉS DE SURFACE DES MATÉRIAUX : TOPOGRAPHIE (RUGOSITÉ MOYENNE) ; CARACTÈRE HYDROPHOBE (ANGLE DE CONTACT À L'EAU)

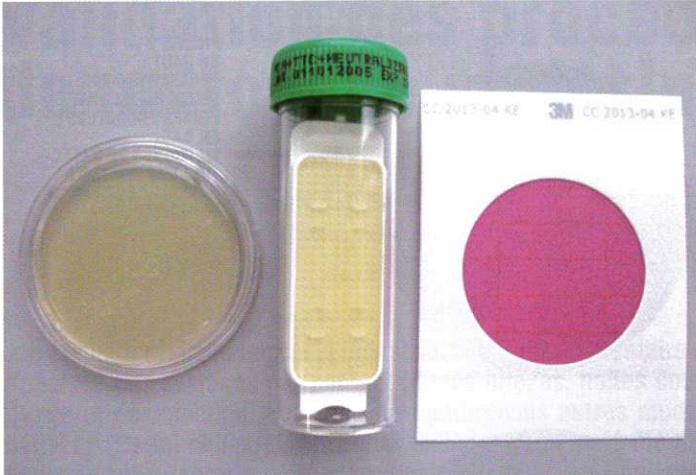


FIGURE 4 : MÉTHODES DE PRÉLÈVEMENT PAR EMPREINTES  
(GAUCHE : BOÎTE CONTACT ; CENTRE : BILAME ; DROITE : PÉTRIFILM™)

recuit brillant 2R (cuves, plans de travail, petits matériels), Téflon (joints), polyéthylène (planche de découpe...), polypropylène (boîtes pour contact alimentaire, bouteilles...). Le verre, proscrit dans les IAA, a été ajouté au panel pour ses propriétés originales (très lisse et très hydrophile).

#### d. Formation des biofilms et mise en œuvre des tests

Les biofilms sont produits à la surface de coupons stériles, immergés horizontalement dans une suspension bactérienne à 25°C pendant 24 h. Après rinçage, la présence de biofilm est estimée par les méthodes commerciales selon les modes opératoires proposés par les fournisseurs. Pour les méthodes de prélèvement par écouvillon, éponge et chiffonnette, les bactéries prélevées sont décrochées de l'outil par vortex puis quantifiées sur gélose nutritive.

## RESULTATS ET DISCUSSION

### 1. L'enquête auprès des industriels (Figure 2)

Dans la plupart des entreprises, l'efficacité des opérations de N&D est validée par contrôle visuel, très rapide et peu onéreux, mais ne permettant pas de déceler les résidus microscopiques (allergène, microorganisme).

Ce contrôle est complété par des méthodes plus sensibles comme les bilames utilisées par près de la moitié des industriels de l'enquête. Le principe de ce test consiste à faire une « empreinte » d'une surface en mettant en contact une gélose nutritive avec la zone à tester : les bactéries cultivables formeront des colonies visibles à l'œil nu en deux à trois jours. D'autres méthodes (3 microbiologiques, 6 biochimiques) ont aussi été citées dans cette étude.

### 2. Tests de contrôle de l'hygiène des surfaces

#### a. Les outils de prélèvement par frottis

La figure 3 présente les outils testés : écouvillons, mousse biseautée, éponge, chiffonnette.

- Nos résultats ont mis en évidence que la récupération des biofilms est très affectée par le matériau récepteur : elle est plus difficile sur les polymères que sur les aciers inoxydables ou le verre.
- Parmi les outils testés, la rayonne et le polyester sont les

moins performants. Trois tests ont donné des résultats intermédiaires à bons, au moins sur les aciers inoxydables et le verre : l'écouvillon QUANTISWAB™, la mousse biseautée Enviro Swab et la chiffonnette. Enfin, l'éponge permet une récupération du biofilm bonne à très bonne quelque soit le matériau.

#### b. Les outils de prélèvement par empreinte

Les trois tests utilisés (boîte contact, bilame, Pétrefilm™, Figure 4) ont donné des résultats positifs pour les deux souches sur la totalité des matériaux. Les résultats sont non quantifiables car les taux de contamination des surfaces étaient élevés. Il n'a donc pas été possible de comparer l'efficacité des différents tests.

#### c. Les outils de détection biochimique

Les tests biochimiques sont présentés dans la figure 5. Les résultats obtenus ont mis en avant que la sensibilité de ces outils est affectée par la molécule cible, les propriétés du matériau récepteur, mais aussi par le design de l'outil de prélèvement.

- Certains outils ont en effet un design peu adapté à des prélèvements sur surfaces irrégulières ou rugueuses, notamment à cause d'une tige de prélèvement très flexible (PRO-Clean™) ou d'une membrane fragile (VERIClean® et Flash), ce qui engendre des résultats non reproductibles et de nombreux faux-négatifs.
- La présence de glucose et le lactose (test SpotCheck Plus™) n'a pas été mise en évidence dans les biofilms testés.
- Quelques tests ont permis de détecter les biofilms sur les différents matériaux, grâce à un virement de couleur très marqué (Figure 5). Il s'agit des outils de détection de protéines Clean-Trace™ Plus, Clean Test et RIDA®CHECK ainsi que du test Speed Check, dont le principe repose sur la mise en évidence du NAD (Nicotinamide Adénine Dinucléotide) et de ses dérivés.

## CONCLUSION

La méthode idéale d'analyse de l'hygiène des surfaces serait rapide, bon marché, fiable, sensible, reproductible et facile d'emploi. Mais ces critères sont difficilement compatibles, surtout lorsque la souillure comprend des microorganismes.

De fait, les industriels des IAA ont souvent recours, pour valider les procédures d'hygiène, à des tests microbiologiques qui présentent l'avantage d'être très sensibles si les microorganismes sont capables de se multiplier dans des milieux de culture choisis. Deux approches existent pour ces tests. On peut tout d'abord prélever la souillure à l'aide d'un outil puis l'analyser par les méthodes classiques de microbiologie. Ces tests demandent une certaine compétence du personnel en charge des analyses, mais permettent l'analyse de surfaces plus ou moins grandes et d'accessibilité plus ou moins marquée. Nos essais ont confirmé que certains outils donnaient de bons résultats pour la recherche de biofilms adhérents : éponge, écouvillon QUANTISWAB™, mousse biseautée Enviro Swab, et, pour les grandes surfaces, chiffonnette. La deuxième approche consiste à réaliser une empreinte d'une surface en mettant en contact un milieu gélosé. Si ces outils requièrent moins de compétence du personnel, leur emploi est limité à des surfaces relativement planes et accessibles.

Si ces méthodes sont souvent sensibles, elles ne sont pas adaptées à la validation en routine des procédures de nettoyage (durée de la réponse de 16 h à 72 h, détection des seuls viables et cultivables). Leur utilisation est de fait limitée à la validation des procédures de désinfection.

D'autres méthodes disponibles dans le commerce reposent sur la détection de souillure organique, qu'elle soit d'origine microbienne ou alimentaire, avec un délai de réponse de quelques minutes, voire quelques secondes. Les tests classiques d'ATPmétrie, non testés dans cette étude, font partie de cette famille de tests : l'ATP est présent dans toutes les cellules (microbiennes mais aussi animales et végétales [aliments]). Nous avons montré dans cette étude que la plupart des tests biochimiques disponibles dans le commerce étaient à même de détecter la présence de biofilms sur des surfaces de différents matériaux (sauf le SpotCheck Plus™, spécifique du glucose et lactose). Dans les conditions expérimentales de cette étude, les tests Clean-Trace™ Plus, Clean Test, RIDA®CHECK et Speed Check ont été les plus performants.

En revanche, ces tests ne discriminent pas les microorganismes vivants/morts ou cultivables/non cultivables. Ils sont donc particulièrement adaptés à la caractérisation de l'hygiène des surfaces, mais pas à la vérification de l'efficacité des opérations de désinfection.

Les résultats de cette étude démontrent clairement l'intérêt d'utiliser les tests biochimiques en routine pour vérifier l'efficacité des procédures d'hygiène (Tableau 2) : par leur rapidité de réponse, leur utilisation permettrait, en cas de non-conformité, de réagir par des actions correctives sur les opérations de N&D. Ces tests représentent donc des méthodes complémentaires, voire alternatives aux méthodes microbiologiques classiques. ■

## RÉFÉRENCES

- Données TIAC 2010. [http://www.invs.sante.fr/content/download/36247/175238/version/2/file/tiac\\_donnees\\_2010.pdf](http://www.invs.sante.fr/content/download/36247/175238/version/2/file/tiac_donnees_2010.pdf)

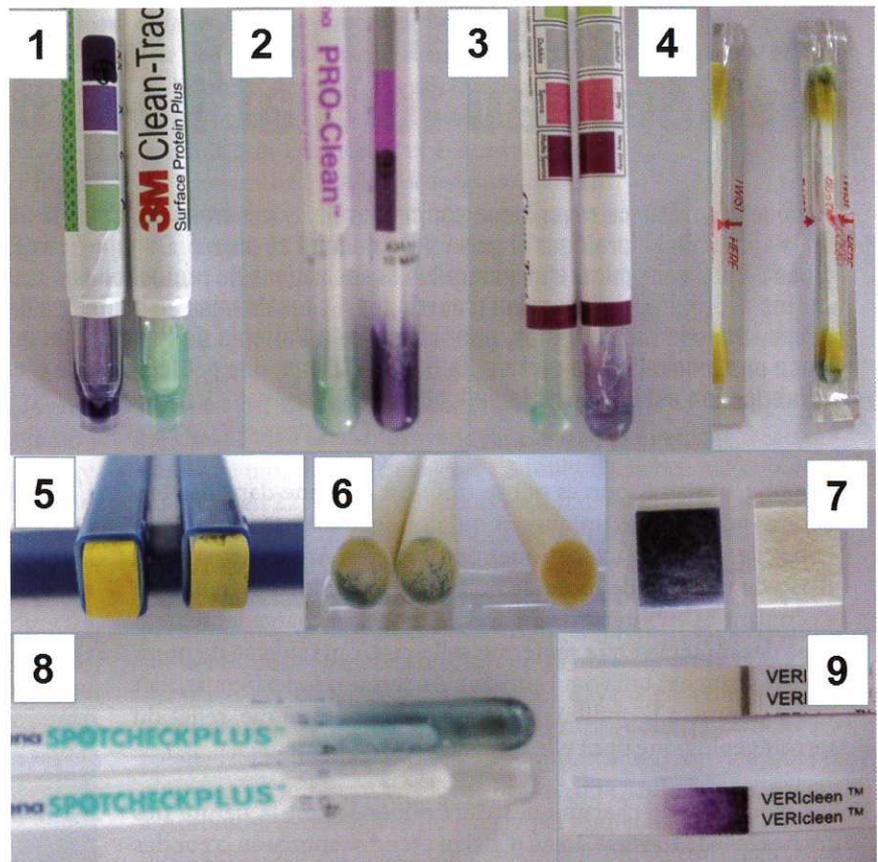


FIGURE 5 : MÉTHODES BIOCHIMIQUES DE DÉTECTION : PROTÉINES (1 : CLEAN-TRACE™ PLUS ; 2 : PRO-CLEAN™; 3 : CLEAN TEST ; 4 : RIDA®CHECK; 5 : FLASH ; 6 : CLEAN-TRACE™ INSTANT) ; NAD(P)/NAD(P)H (7 : SPEED CHECK) ; GLUCOSE ET LACTOSE (8 : SPOTCHECK PLUS™) ; RÉSIDUS ALIMENTAIRES (9 : VERICLEEN®)

- Règlement (CE) n° 852/2004 du Parlement européen et du Conseil du 29 avril 2004 relatif à l'hygiène des denrées alimentaires - JO L 139 du 30.4.2004, p. 1-54

## REMERCIEMENTS

Ces travaux ont été subventionnés dans le cadre XIIIème Contrat de Plan Etat-Région (région Nord-Pas de Calais), Projet DRAAF n°CP 13 HN/NPdc 10 05 et dans le cadre du réseau mixte technologique CHLEAN « Conception Hygiénique des Lignes et Equipements et Amélioration de la Nettoyabilité ».

	Prélèvement par frottis	Prélèvement par empreinte	Détection biochimique
Facilité de mise en œuvre	++*	+	+++
Accessibilité	+	+/-	++
Durée	24 h - 72 h	24 h - 72 h	< 15 min
Sensibilité détection bactéries	++ Sauf mortes, VNC	++ Sauf mortes, VNC	+
Sensibilité détection matière organique	-	-	+
Influence manipulateur	+	+/-	+
Influence matériau	+	+	+
Consommables	Bon marché*	Bon marché	Bon marché

TABLEAU 2 : AVANTAGES ET INCONVÉNIENTS DES DIFFÉRENTS TESTS | TABLE 2: ADVANTAGES AND DRAWBACKS OF THE VARIOUS TESTS

\* : fonction des analyses ultérieures