



MEMOIRE DE MASTER

Filière : Biologie Moléculaire et Cellulaire

Option : MICROBIOLOGIE

Présenté par

HADJLAT Ghyselene-Zahia

Intitulé du Thème

Evaluation de la contamination bactérienne de l'eau des machines
de dialyse au service de néphrologie CHU de Tlemcen

- Recherche de biofilm -

Soutenu le : 30/06/2013

Devant le Jury composé de :

Dr. KHELIL N

Maitre de conférences A

Dr. HASSAINE H

Maitre de conférences A

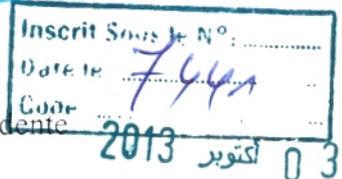
Dr. REBIAHI S-A

Maitre de conférences B

Présidente

Promotrice

Examineur



Année Universitaire : 2012-2013



MAST-279-31 / 01

MEMOIRE DE MASTER

Filière : Biologie Moléculaire et Cellulaire

Option : MICROBIOLOGIE

Présenté par

HADJLAT Ghyselene-Zahia

Intitulé du Thème

Evaluation de la contamination bactérienne de l'eau des machines
de dialyse au service de néphrologie CHU de Tlemcen

- Recherche de biofilm -

Soutenu le : 30/06/2013

Devant le Jury composé de :

Dr. KHELIL N

Maitre de conférences A

Dr. HASSAINE H

Maitre de conférences A

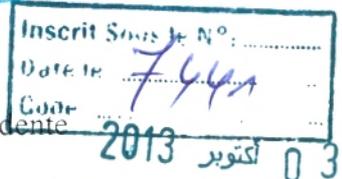
Dr. REBIAHI S-A

Maitre de conférences B

Présidente

Promotrice

Examineur



Année Universitaire : 2012-2013



UNIVERSITE ABOUBEKR BELKAID TLEMCEEN
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
et des Sciences de la Terre et de l'Univers
Département de Biologie

Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire, au Biomédical et à l'Environnement
مخبر الميكروبيولوجيا التطبيقية للاغذية للبيوطي والبيئة



MAST-279-31/01

MEMOIRE DE MASTER

Filière : Biologie Moléculaire et Cellulaire

Option : MICROBIOLOGIE

Présenté par

HADJIAT Ghyselene-Zahia

Intitulé du Thème

Evaluation de la contamination bactérienne de l'eau des machines
de dialyse au service de néphrologie CHU de Tlemcen

- Recherche de biofilm -

Soutenu le : 30/06/2013

Devant le Jury composé de :

Dr. KHELIL N

Maitre de conférences A

Dr. HASSAINE H

Maitre de conférences A

Dr. REBIAHI S-A

Maitre de conférences B



Inscrit Sous le N°:
Date:	7/6/13
Codr
Présidente	2013 أكتوبر 03

Présidente

Promotrice

Examineur

Année Universitaire : 2012-2013

Remerciements

J'exprime ma profonde gratitude à mon promoteur Mme **HASSAINE Hafida** née **TERKI HASSAINE** maître de conférences A au département de biologie moléculaire et cellulaire à l'université **ABOU BAKR BELKAID** de Tlemcen, qui m'a honoré de sa confiance et qui a bien voulu guider et juger ce travail. Je lui suis très reconnaissante pour ses précieux conseils, ses compétences, son savoir faire ; ainsi que ses sympathies, simplicités, modesties, disponibilités et gentillesse.

Je suis très sensible à l'honneur que me fait Mme **KHELLIL Nihel**, maître de conférences A au département de biologie moléculaire et cellulaire à l'université **ABOU BAKR BELKAID** de Tlemcen de présider le jury. Je lui adresse mes sincères remerciements et ma profonde gratitude.

Je remercie également Mr **REBIATHI Sid Ahmed**, maître de conférences B au département de biologie moléculaire et cellulaire à l'université **ABOU BAKR BELKAID** de Tlemcen qui me fait le grand honneur de faire partie du jury de cette thèse. Je l'assure de ma profonde gratitude, ainsi que de ma sincère reconnaissance.

DEDICACES

Avec l'aide de Dieu tout puissant et tous les gens qui m'aiment et qui m'ont soutenu j'ai pu achever ce modeste travail que je dédie à :

Mes très chers parents : Nulle dédicace ne peut exprimer ce que je dois pour vos sacrifices et votre patience durant mes années d'études. Ce travail n'est qu'un humble témoignage de mon grand et éternel amour, de mon infinie reconnaissance et de mon attachement indéfectible. Que Dieu préserve votre santé et vous accorde longue vie.

A mes deux sœurs , NITIE et Yasmine

A mes grands parents, que je leurs souhaite une longue vie

A mes cousins, cousines, amis.

A mes tantes et oncles (lotfi, kamel, lamia, wafaa et dounia)

A tous les amis que j'ai eu la chance de rencontrer au cours de ces trois mois, Samia, wafaa, et je vous remercie pour votre aide et votre générosité.

A toute ma promotion Microbiologie LMD et à tous mes professeurs qui m'ont appris avec cœur tous ce que je sais.

A tous les gens que j'aime.

Sommaire

I- Introduction	1
II- Synthèse bibliographique	4
1. Rôle des reins	5
2. Généralités sur la dialyse	5
2.1 Définition de l'insuffisance rénale	6
2.2 Objectifs de l'hémodialyse	6
2.3 Le procédé de l'appareil de dialyse	6
2.4 Equipements de l'appareil de dialyse	7
2.5 La réglementation	8
3. L'eau de dialyse	8
3.1 Définition de l'eau de dialyse	8
3.2 Circuit de l'eau de dialyse	9
3.3 Le traitement de l'eau de dialyse	10
3.4 La composition de l'eau de dialyse	12
3.5 Circuit du dialysat	12
3.6 Les normes du dialysat	13
4. Le risque infectieux « bactérien » en dialyse	15
5. La désinfection	17
5.1 Le nettoyage	17
5.2 Le détartrage	17
5.3 La désinfection	18
III- Matériel et méthodes	20
1. Lieu d'étude	21
2. Prélèvements	21
3. Ensemencement	21
3.1 L'eau de dialyse	21
3.2 Les écouvillons	22
4. Isolement et purification	22
5. Identification	22

5.1 Identification par galerie API20E	22
5.2 Identification par galerie API Staph	23
5.3 Test de coagulase	24
6. Evaluation de la formation de biofilm	24
6.1 Méthode de plaque de culture de tissus (TCP)	24
6.2 Méthode du rouge congo	25
7. Evaluation de l'efficacité de l'agent désinfectant sur le biofilm	26
IV- Résultats et discussion	28
1. Niveau de contamination	29
2. Etat de contamination de l'eau de dialyse	30
2.1 Avant entrée à la machine de dialyse (après traitement)	30
2.2 Avant désinfection de la machine	31
2.3 Après désinfection de la machine	33
2.4 Par ecouvionllange dans la tubulure de la machine de dialyse	35
3. Détection des souches formatrices de biofilm	36
3.1 Par la technique du Rouge Congo Agar	36
3.2 Par la méthode de plaque de culture de tissus (TCP)	36
4. Evaluation de l'efficacité de l'agent désinfectant sur le biofilm	38
V- Conclusion	40
VI- Références bibliographiques	42

Liste des tableaux :

Tableau 1 : La composition chimique du dialysat.

Tableau 2 : Les normes physicochimique de l'eau de dialyse.

Tableau 3 : Fréquence des paramètres surveillés en fonction du nombre de séance.

Tableau 4 : Les normes bactériologique de l'eau de dialyse.

Tableau 5 : Nombre de souches identifiées.

Tableau 6 : Les souches bactériennes retrouvées avant la désinfection.

Tableau 7 : Les souches bactériennes retrouvées après la désinfection.

Tableau 8 : Les souches bactériennes retrouvées par écouvillonnage.

Tableau 9 : L'effet de l'acide péracétique sur la formation de biofilm.

Liste des figures :

Figure 1 : Le circuit de l'eau de dialyse.

Figure 2 : Le circuit du dialysat.

Figure 3 : Le risque bactérien.

Figure 4 : Le dispositif de filtration.

Figure 5 : Dépistage des producteurs de biofilm par la méthode TCP.

Figure 6 : Un tapis bactérien sur le filtre.

Figure 7 : Staphylocoque sur le milieu Rouge Congo Agar.

Figure 8 : Les DO des souches à Gram négatif

Figure 9 : Les DO des souches à Gram positif.

L'insuffisance rénale touche un grand nombre de patients estimé à 64 en 2012 au CHU Tlemcen service de néphrologie, la majorité de ces patients sont traités par hémodialyse chronique, très peu d'autres sont traités par dialyse péritonéale, et récemment par une transplantation d'un nouveau rein compatible (**Données du service de Néphrologie**).

Les malades insuffisants rénaux chroniques traités par hémodialyse ont une espérance de vie qui progresse régulièrement avec l'amélioration des techniques, elle peut être estimée actuellement à plus de 30 ans. La durée et surtout la qualité de cette survie sont directement influencées par différents facteurs (durée des séances, correction des troubles associés...) parmi lesquels la pureté chimique et bactériologique des solutés de dialyse tient une large place en raison de l'importance des échanges entre ces solutés et le sang du malade à travers une membrane de dialyse de quelques microns d'épaisseur. Pendant une séance de 4 heures, 120 litres de soluté sont ainsi indirectement en contact avec le sang (**Frankian, Rangon, Donadey, 1996**).

Le patient en dialyse chronique est particulièrement sujet aux infections pour des raisons liées à sa pathologie mais aussi à son traitement. Toute séance d'hémodialyse peut exposer le patient au risque infectieux via l'abord vasculaire ou via une contamination du dialysat. L'eau d'alimentation des générateurs est une des sources les plus fréquentes de cette contamination, d'où la nécessité d'être très vigilant sur la qualité de cette eau. Celle-ci est produite à partir de l'eau de ville et subit un traitement qui lui confère une qualité physicochimique et microbiologique adaptée à la dialyse. Or certains éléments du traitement sont susceptibles de favoriser la prolifération bactérienne (adoucisseur, charbon actif, bras morts, connexions,...) et un biofilm peut rapidement s'installer sur le circuit, la boucle ou le générateur (**Nesa- eoha , 2007**).

Le liquide de dialyse se compose de 99% d'eau par osmose inverse, en outre, des produits chimiques sont ajoutés, tels que les acides et les sels de bicarbonate.

Une unité de dialyse de taille moyenne produit plus de 1.000.000 litres de liquide de dialyse par an. Dans le monde, la production de liquide de dialyse est d'environ 25, 000, 000.000 litres, ce qui en fait l'un des liquides des plus grands volumes produits utilisé en médecine. Il ya environ 28.500 unités de dialyse à travers le monde (**Nystrand, 2008**).

Il est donc nécessaire et essentiel d'apporter une attention particulière à la production de cette eau, car il existe peu de « médicament administré » à la dose annuelle de 1.000.000 litres, dont la composition est essentiellement de l'eau (**Nesa- eoha , 2007**).

Nos objectifs sont d'analyser tous les risques majeurs, liés au traitement d'eau en hémodialyse afin de :

- Identifier et évaluer les principaux dangers et risques bactériologique.
- Rechercher une contamination bactérienne de l'appareil de la dialyse
- Evaluer la formation de biofilm *in vitro* chez quelques bactéries contaminantes
- Evaluer l'efficacité de l'agent désinfectant utilisé au service sur la formation de biofilm

Partie bibliographique

1. Le rôle des reins :

Schématiquement les reins ont deux fonctions distinctes : l'une exocrine, l'autre endocrine.

- La fonction exocrine : Elle a pour but l'élimination des substances provenant du catabolisme des produits alimentaires ou de la dégradation cellulaire. L'excrétion fait appel à deux fonctions répondant à l'anatomie du rein. Le rein est formé d'unités fonctionnelles, le néphron, lequel est segmenté en glomérules et tubules. Le rôle du glomérule est d'assurer une ultrafiltration plasmatique.
- La fonction endocrine : Parallèlement et indépendamment de cette fonction exocrine, le rein a un rôle endocrine essentiel. Les hormones secrètes par le rein sont au nombre de quatre : l'érythropoïétine, la vitamine D, la rénine, et les prostaglandines.

Il peut s'écouler des années entre l'apparition de la maladie rénale et la survenue d'une insuffisance rénale majeure qui aboutira à la dialyse. Ceci est la conséquence de l'adaptation néphrotique à la maladie rénale primitive avec mise en jeu d'un phénomène d'amplification rénale permettant d'accroître la fonction de chaque néphron sain au détriment de son altération progressive ultérieure due à un hyperfonctionnement néphrotique.

La dialyse ne sera envisagée que lorsque la clairance rénale se situera entre 6 et 10 ml/min, et qui correspond donc à une détérioration de la fonction rénale de l'ordre de 90 à 95 % (Donadey et al., 1998).

2. Généralités sur la dialyse :

2.1 Définition de l'insuffisance rénale :

Une insuffisance rénale se caractérise par une diminution de la fonction et du nombre des néphrons « unités de base constituant le rein et servant à débarrasser le sang des toxines qu'il contient, en élaborant l'urine primitive » (Bilodeau, 2007).

- **P'insuffisance rénale chronique :**

L'insuffisance rénale chronique se définit par une diminution prolongée, souvent définitive, des fonctions rénales exocrines et endocrines. Elle s'exprime essentiellement par une diminution de la filtration glomérulaire avec augmentation de la créatininémie et de l'urée sanguine (urémie) par diminution de la clairance de la créatinine (Maurizi-Balazanet et Zoui, 2005).

- **Insuffisance rénale aiguë :**

L'insuffisance rénale aiguë, contrairement à l'insuffisance rénale chronique, est généralement réversible et guérit le plus souvent. Elle est due à une diminution brutale et importante de la circulation sanguine, avec chute de la pression artérielle « choc hypovolémique » (Bilodeau, 2007).

2.2 Objectifs de l'hémodialyse :

L'Hémodialyse est une technique qui permet la survie d'un patient ayant une insuffisance rénale. Le soi-disant «rein artificiel» traite le sang du patient à travers une membrane semi-perméable contre une solution saline, ce qui élimine l'excès d'électrolytes, certains déchets toxiques et l'eau (Morin, 2000).

L'hémodialyse est la plus ancienne des techniques de suppléance rénale. Elle reste la méthode d'épuration de référence dans le traitement de l'insuffisance rénale mais ses indications se sont trouvées modifiées par le développement des techniques d'épuration extrarénale continues. L'hémodialyse au cours d'un demi-siècle d'utilisation a bénéficié de progrès technologiques considérables portant sur les générateurs de dialyse, le traitement de l'eau, la composition du dialysat, les membranes de dialyse, les accès vasculaires, améliorant la qualité de l'épuration et la sécurité des séances d'hémodialyse (Acquet et al., 2005).

Si la dialyse ne guérit pas l'insuffisance rénale, elle permet de survivre tout en tentant de mener une existence aussi «normale» que possible, en attendant une éventuelle transplantation (Hoarau, 2011).

2.3 Le procédé de l'appareil de la dialyse :

La dialyse épure le sang au travers d'une membrane semi-perméable grâce à des échanges entre le sang et un liquide de dialyse contenant des électrolytes à une concentration voisine de celle du plasma (dialyse). Dans le cas de l'hémodialyse, on prélève le sang par ponction d'une veine du bras. Ce sang est conduit dans un tuyau jusqu'à une cartouche ou dialyseur. Celui-ci contient de très nombreuses fibres qui font office de membrane semi-perméable au travers desquelles se font les échanges entre le sang et le dialysat. A la sortie du filtre, le sang épuré est restitué au malade par l'intermédiaire d'une deuxième ponction veineuse (Richet, 2011).

2.4 Équipement de la dialyse :

- **L'accès au sang** : il se fera par l'intermédiaire d'une voie d'abord artérioveineuse réalisée chirurgicalement pour permettre une communication directe d'une artère et d'une veine (fistule) ou indirecte (pontage). En l'absence de fistule artérioveineuse, un cathéter veineux sera pose transitoirement à chaque séance (cathéter fémoral) ou placé à moyen terme dans un accès veineux central (plusieurs semaines ou plusieurs années) en veine jugulaire et « tunellisée » dans la région pectorale (**Donaday et al., 1998**).
- **La membrane** : ce terme désigne le dispositif utilisé pour épurer le sang de molécules et toxines urémiques (potassium, urée, créatinine, phosphate, etc.). Ce dispositif, connecté à la machine de dialyse, est généralement constitué par une membrane à fibres creuses (plusieurs milliers de capillaires) dans lesquelles circule le sang alors que le liquide de dialyse circule entre elles. La surface de membrane la plus couramment rencontrée est de 1.8 m² pour un patient adulte (**Boubaker et al., 2002**).
- **Le dialyseur** : qui assure l'échange entre le sang et la solution délivrée par le générateur. Le dialysat, circulant à contre-courant du sang dans le dialyseur, permet l'épuration des déchets contenus dans le sang (**Abdelaziz et al., 2000**).
- **Le dialysat** : il est fabriqué par le générateur, par dilution de concentrés et d'eau préalablement traitée. Sa composition est proche de celle du plasma sanguin normal, à l'exception des protéines dont il est totalement dépourvu (**Donaday et al., 1998**).
- **Le générateur** : un générateur pour hémodialyse est un appareil qui permet de réaliser da dilution de solutions concentrées (acides, basiques, et glucosé), par l'eau pour hémodialyse, afin d'obtenir un dialysat nécessaire a l'épuration sanguine des patients (**Sautou et al., 2000**).

2.5 La réglementation :

Tous les fluides utilisés en dialyse sont répertoriés dans diverses recommandations concernant la qualité microbiologique et sont également des cibles pour l'échantillonnage microbiologique. Maintenant, il commence à être intéressant, comme une certaine valeur, par

exemple la limite 100CFU/ml, n'est pas la même dans la pratique lorsque différentes techniques de culture microbiologique sont comparées. Le nombre 100 UFC /ml analysées à l'aide d'une gélose de tryptone à l'extrait de glucose (pendant 7 jours / incubation entre 17-23 ° C) correspond à 0.1-1CFU/ml si la méthode avait été utilisée avec de la gélose de tryptone de soja (pendant 48 heures / incubation à 35 ° C).

Il est évident qu'un problème se pose quand une méthode de vérification de la qualité microbiologique utilisée est sensible. En fait, le choix de la technique de culture microbiologique est une décision aussi importante que le résultat de l'analyse peut être utilisé pour déterminer les intervalles de la stratégie de désinfection, de ce fait son influence est sur la qualité hygiénique du système.

L'utilisation d'une technique de culture insensible indique une croissance faible et conduit à de longs intervalles entre les désinfections sur la base de l'analyse de culture (**Nystand, 2008**)

3. L'eau de dialyse :

Plus l'eau est pure, plus le traitement est sûr. Les impuretés présentes dans l'eau de dialyse sont de plus en plus considérées comme des facteurs de risque susceptibles de nuire à la santé et à la qualité de vie du patient. Sans une désinfection préventive efficace du circuit de distribution, les contaminations biologiques laissent des dérivés qui traversent les membranes des dialyseurs et passent dans le sang du patient, ce qui provoque des réponses cytokiniques pro-inflammatoires (**Gambro, 2010**).

3.1 Définition de l'eau de dialyse :

L'eau de dialyse sert de liquide de dilution des solutions concentrées d'acide et de tampon permettant l'élaboration du dialysat par le générateur d'hémodialyse.

Le dialysat est un élément majeur de l'efficacité et de la biocompatibilité du système d'épuration et donc de la sécurité du traitement.

En effet, chaque séance d'hémodialyse expose le malade, par l'intermédiaire de la membrane de dialyse, au contact du dialysat dont 120 à 200 l parcourent la membrane au cours d'une séance de traitement. Par ailleurs, les techniques de réinjection en ligne utilisent, après filtration, une partie du dialysat préparé comme liquide de réinjection et nécessitent des

précautions supplémentaires puisque le même volume de substitution peut être administré au malade (Dorez et Soule, 2009).

3.2 Le circuit de l'eau de dialyse :

L'eau servant à la préparation du dialysat provient du réseau d'eau potable et n'est pas stérile elle nécessite donc un traitement afin d'éliminer les substances potentiellement toxiques pour les malades à savoir, les micropolluants minéraux ou organiques (métaux lourds, chloramines...), les microorganismes et les pyrogènes (figure 1). Une installation de traitement d'eau comporte différents étages de traitement qui peut représenter eux même des sites de prolifération microbienne (filtre à sable, adoucisseur, filtre à charbon...).

Parmi les dispositions techniques, les filières de traitement d'eau pour dialyse et le réseau de distribution doivent être conçues pour pouvoir être désinfectés afin de garantir une absence de contamination des circuits de dialyse (Ducki et al., 2005).

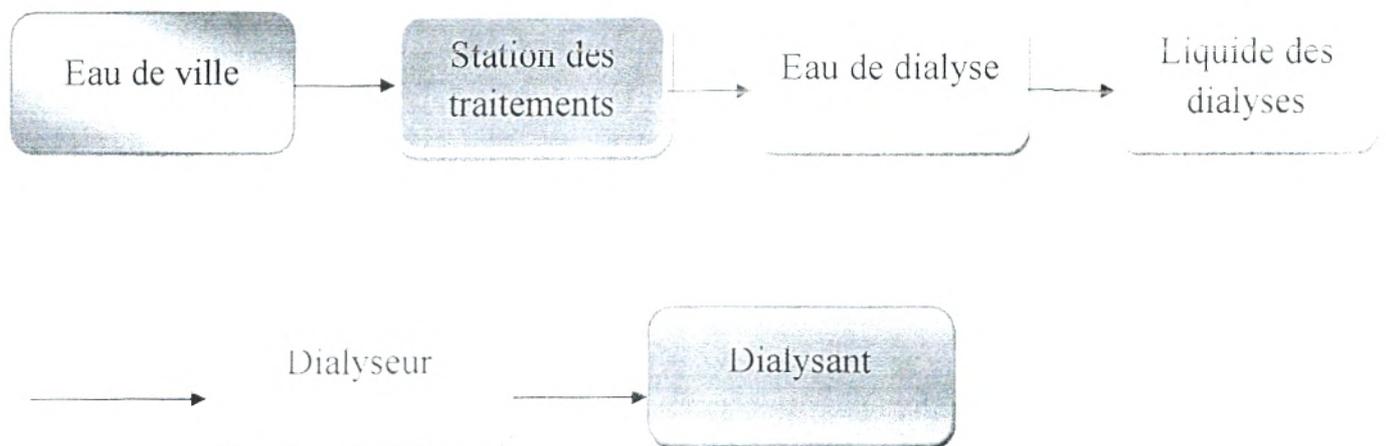


Figure 1 : Circuit de l'eau (Boubaker et al., 2002)

3.3 Le traitement de l'eau de dialyse :

- **Les filtres à particules :** Des filtres de porosité dégressive (du filtre à sable à la cartouche filtrante 0.2 µm) sont disposés à plusieurs niveaux de l'installation pour à la fois améliorer la qualité particulaire et au bactériologique à chaque étape du traitement. La filtration permet notamment de protéger l'osmoseur d'un relargage de particules de charbon actif. Lorsque les carters de filtres sont réalisés en matériaux translucides pour contrôler visuellement leur colmatage, il peut être nécessaire de les

protéger de la lumière pour éviter le développement d'algues, photosensibles du type *Chlorella* (**Frenkian, Ragon, Donadey, 1996**).

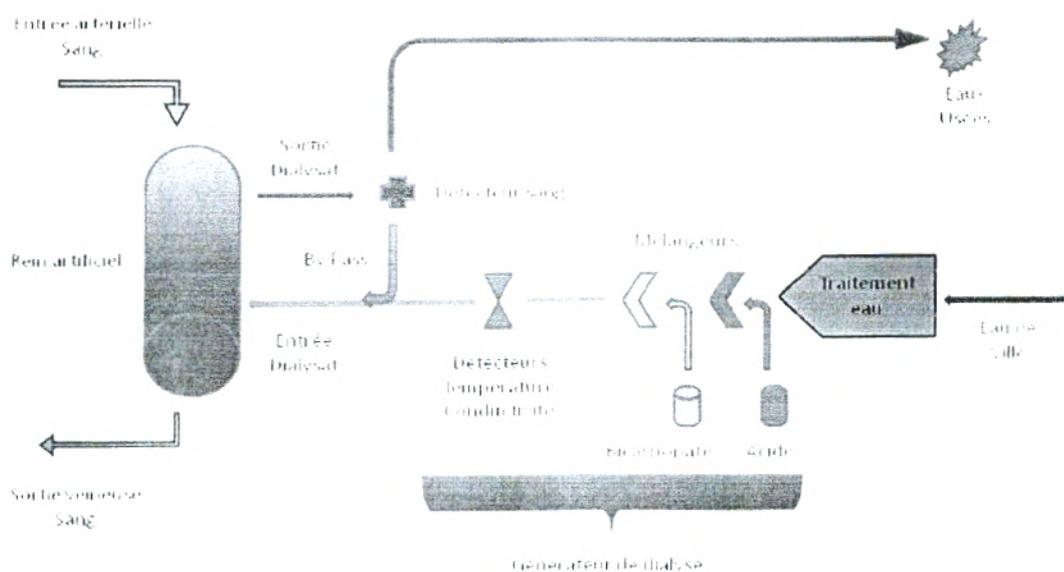
- **L' adoucisseur d'eau** : l'objectif est la Suppression des ions calcium (Ca^{++}) et magnésium(Mg^{+}) présents dans l'eau (responsable de la dureté), de façon à obtenir, en sortie, un taux maximal de 4 mg par litre de Ca^{++} . L'adoucisseur ayant pour but de retenir des ions charges positivement, son principe de fonctionnement repose sur l'échange de ces ions avec l'ion sodium Na^{+} . Pour y parvenir, on utilise des résines composées de petites billes de polystyrene sulfone (SO_3H^{-}) chargées négativement. Elles sont neutralisées par des ions Na^{+} obtenus par le passage de sel NaCl , c'est le cycle sodique. Lorsqu'elles sont en contact avec les cations contenus dans l'eau, les résines se déchargent des ions Na^{+} qui leur « cèdent la place » : c'est la permutation sodique. Cette réaction est réversible, avant la saturation des résines en ions calcium (Ca^{++}), magnésium (Mg^{++}), fer (Fe^{++}), aluminium (Al^{+++}), une régénération est déclenchée par l'intermédiaire du sel NaCl , le Na^{+} se fixe sur les résines, le Cl^{-} est rejeté à l'égout (**Abdelaziz et al., 2000**)
- **Filtres granulaires à charbon actif** : Les granules de charbon (charbon de bois) sont activées par traitement thermique qui sera adsorbé par le chlore, les chloramines et d'autres matières et substances organiques de l'eau. Le charbon actif supprime également le chlore par une action catalytique, ce qui entraîne la conversion de chlore dans de l'acide chlorhydrique qui est neutralisé par les bicarbonates présents dans l'eau. L'eau d'alimentation doit rester en contact avec le carbone suffisamment long temps pour permettre l'enlèvement adéquat de chloramines. La US Food and Drug Administration(FDA) recommande un minimum de 10 minutes. Comme les filtres de carbone sont très poreux avec une haute affinité pour les matières organiques, ils peuvent être contaminés par des bactéries s'ils ne sont pas entretenus correctement ou remplacée fréquemment (**Tong et al., 2001**).
- **L'osmose inverse** : L'osmoseur est l'élément central de l'installation de traitement d'eau; c'est sur son efficacité que repose l'essentiel du processus. La membrane d'osmose représente la frontière entre « deux eaux » de qualité et de compositions différentes :

Tableau 1 : La composition chimique du dialysat (Jacquet et al., 2005).

Composition chimique	Concentrations « limites » (mmol/L)	Concentrations « usuelles » (mmol/L)
Sodium	135-160	140 - 145
Potassium	0-4	2-3
Chlore	87 - 120	105
Calcium	0-2	1,75
Magnésium	0 – 0,75	0,75
Bicarbonate	25-40	30 - 35
Glucose	0 - 11	0 – 5,5

3.5 Circuit du dialysat :

Le dialysat dans une machine de dialyse empreinte un circuit qui passe par de différentes étapes et qui sont représentées dans la **figure 2**.

**Figure 2** : le circuit du dialysat (Briat et al., 2010)

3.6 Les normes d'une eau de dialyse :

L'épuration extrarénale nécessite l'utilisation de dispositifs médicaux variés et de produits Pharmaceutiques divers qui doivent être conformes à des normes physicochimiques (**Tableau 2**) et bactériologique (**Tableau 3**) (Donadey et al., 1998).

- Normes physicochimiques :

Tableau 2 : les normes physicochimique de l'eau de dialyse (Dorez, Soule, 2009)

Analyse	limite	Fréquence dialyse à base	Fréquence dialyse approfondie
Conductivité	< 4 us/cm	Continue	
pH	4,4—7,4	Mensuelle	
Carbone organique	< 0,8 mg l		
Sodium	< 50 mg/l	Mensuelle	
Potassium	< 2 mg/l	Mensuelle	
Calcium	< 2 mg/l	TH quotidien	
Magnésium	< 2 mg l	Mensuelle	
Chlore	< 0,1 mg/l	Continue	
Nitrates	< 2 mg/l	Mensuelle	
Aluminium	< 10 _g/l	Mensuelle	
Fluorures	< 0,2 mg l		Trimestrielle
Ammonium	< 0,2 mg l		Trimestrielle
Nitrites	< 0,005 mg/l		Trimestrielle
Sulfates	< 50 mg/l		Trimestrielle
Orthophosphates	< 5 mg/l		Trimestrielle
Zinc	< 100 _g l		Trimestrielle
Plomb	< 5 _g/l		Trimestrielle
Mercure	< 1 _g/l		Trimestrielle
Fer	< 100 _g l		Trimestrielle
Cuivre	< 100 _g l		Trimestrielle
Cadmium	< 1 _g l		Trimestrielle
Étain	< 100 _g/l		Trimestrielle
Manganèse	< 100 _g/l		Trimestrielle

- Normes bactériologique :

Deux organismes principaux, dont les principales recommandations sont résumées

Dans le **tableau 3**, éditent des normes pour la qualité de l'eau de dialyse. Il s'agit de la

Pharmacopée Européenne, et de l' «Association for the Advancement of Medical Instrumentation(AAMI)» (Boubaker *et al.*, 2002).

Tableau 3 : Les normes bactériologique de l'eau de dialyse (Boubaker *et al.*, 2002).

	Pharmacopée Européenne	Pharmacopée Européenne	AAMI	AAMI
	CFU/ml	EU/ml	CFU/ml	EU/ml
Eau de dialyse (entrée de la machine)	<100	<0,25	<200	NS
Liquide de dialyse (Dialysat selon Nomenclature USA) (sortie de la machine)	NS	<0,25	<200	NS

CFU = colony forming units (définit la teneur en bactéries)

EU = endotoxine (définit la teneur en endotoxines)

NS = Non spécifié

Le risque de la contamination chimique est lié directement avec le nombre de séance, le (Tableau 4) montre cette relation :

Tableau 4 : Fréquence des paramètres surveillés en fonction du nombre de séances assurées chaque année (Sautou, 2011)

Nombre de séance	<200	200 A 1000	1000 A 10000	>10000
Fréquence de contrôle microbiologique	1 fois/an	2 fois/an	4 fois/an	12 fois an

4. Le risque infectieux « bactérien » en dialyse :

L'eau servant à la préparation du dialysât provient du réseau et n'est pas stérile, elle nécessite donc un traitement. Malgré celui-ci des bactéries dites Gram - ont la possibilité de se multiplier assez rapidement dans l'eau pure sans aucun nutriment. Elles résistent également aux désinfectants. Certains constituants de la paroi des bactéries Gram -, les endotoxines,

peuvent exercer des effets biologiques sur les patients même en l'absence de bactéries. Elles correspondent au composé Lipopolysaccharidique (LPS) (**Jacquet, Ricard, Thomas.1999**).

Certains micro-constituants sont réellement impliqués dans un risque hydrique, tels des métaux lourds (plomb, cadmium) ; des interrogations subsistent pour certaines molécules organiques (pesticides, haloformes) et, même pour les sous-produits minéraux ou organiques de la désinfection (chloration surtout) des eaux (**Hartemann, 2004**).

Les différents procédés qui interviennent dans le traitement de l'eau peuvent être eux même à l'origine de prolifération microbienne. Les filtres à charbon, les adoucisseurs sont de véritables niches écologiques et doivent donc faire l'objet de procédures d'entretien, de nettoyage et de désinfection (**Ducki et al., 2005**).

Toutes les zones du circuit où il y a stagnation de liquide ou un faible débit, présentent un risque accru de formation du biofilm (**figure 3**). Les systèmes de distribution centralisée du concentré bicarbonate présentent un risque élevé. Parmi les zones également sensibles, on trouve la surface interne des tuyaux de raccordement de l'unité de traitement d'eau aux appareils d'hémodialyse, ou celle du circuit reliant la boucle de distribution aux générateurs d'hémodialyse et particulièrement le circuit primaire des générateurs. En fait, il a été montré que la quantité d'endotoxines dans le liquide de dialyse se développe proportionnellement à la longueur des tuyaux entre le système d'osmose inverse et le générateur. Il est facile pour le biofilm de se développer dans des zones comme la surface interne des tuyaux car peu de systèmes permettent de désinfecter ces zones quotidiennement (**Gambro, 2010**).

Pour cela Le choix du matériau des tuyaux est important pour répondre aux exigences des systèmes d'hémodialyse. Ils doivent être solides, flexibles, résistants à la chaleur, inertes chimiquement, et disposer d'une surface interne lisse (**Ledebo, 2010**).

En résumé, le **Tableau 5** montre les sources de contamination et les facteurs favorisant.

Tableau5 : Les sources de contamination d'origine bactérienne et les facteurs favorisant (Baron *et al.*, 2005).

Sources de contamination d'origine bactérienne	Facteurs favorisant la contamination du dialysat
Bicarbonate	Bicarbonate en solution
Eau pour hémodialyse : Chaîne de production d'eau	Dysfonctionnements ou défauts de conception et/ou réalisation de la chaîne de traitement d'eau et/ou de maintenance (bras morts, rupture de membrane d'osmose, renouvellement des filtres insuffisants, surcharge bactérienne et endotoxiniques du réseau général d'eau - Fréquence et technique de désinfection inadaptees favorisant la formation de biofilm
Raccord entre la boucle de distribution d'eau et le générateur	Absence de désinfection des raccords favorisant la formation de biofilm
Circuit hydraulique du générateur	Zones du circuit inaccessibles à la désinfection - Complexité de structure des circuits du générateur - Température du dialysat (37°) - Paramètres de désinfection inefficace - Absence de dispositif de contrôle et d'alarme en cas de non aspiration du désinfectant - Fréquence de traitement insuffisante - Détartrage et nettoyage insuffisants favorisant la formation de biofilm - Méthodes de désinfection inefficaces sur le biofilm - Stagnation prolongee sans desinfectant lié à un rythme d'utilisation irrégulier
Système de drainage à l'égout	- Rétrocontamination du tuyau d'écoulement du dialysat usagé, mal désinfecté - Contact entre tuyau d'écoulement et système de raccordement à l'égout

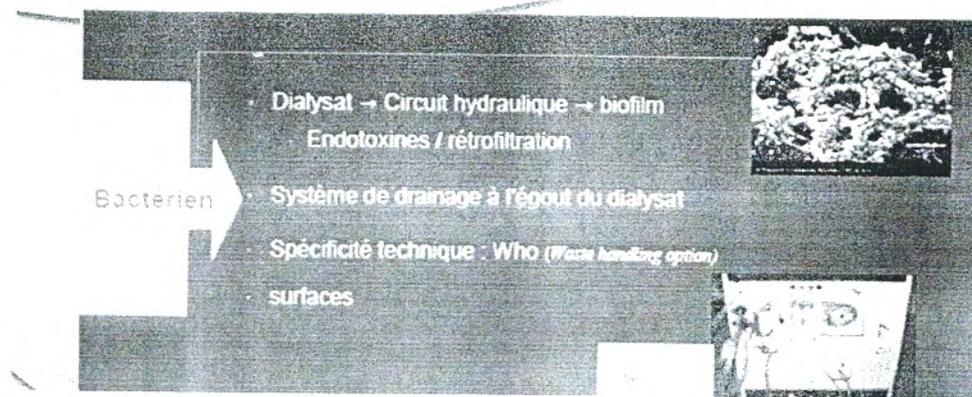


Figure 3: Le risque bactérien (Kammoun, 2011)

5. La désinfection de l'appareil de la dialyse :

L'intérêt de la désinfection des générateurs et des circuits de dialyse par des solutions à base d'acide peracétique n'est plus à démontrer. Cependant et afin de garantir l'efficacité de cette procédure, elle doit nécessiter toutes les précautions utiles et une utilisation rationnelle, en particulier au niveau de la phase de rinçage (Ducki et al., 2005).

5.1 Le nettoyage:

Le nettoyage du circuit hydraulique des générateurs, a pour objectif d'éliminer les dépôts organiques (graisses et protéines) véhiculés par le dialysat après échange. Il n'existe pas de produit ou procédé spécifique à cet usage. Des produits chlorés, notamment l'hypochlorite de sodium, peuvent être utilisés lors de cette étape et permettent de réaliser simultanément une désinfection (Baron et al., 2005).

5.2 Le détartrage :

Il consiste en l'élimination des dépôts de carbonate de calcium et de magnésium. Le détartrage joue un rôle essentiel dans la prévention du biofilm et pourrait participer à son élimination. L'acide acétique (3 %) et l'acide citrique sont utilisés pour le détartrage à des concentrations variables (0,2 à 6 %). Des traitements thermochimiques associant l'acide citrique à la chaleur permettent de réaliser de façon simultanée le détartrage et la désinfection. En fonction du générateur, mais également de la technique de désinfection appliquée, le fabricant du générateur devra préciser les fréquences et moyens à mettre en œuvre pour effectuer le détartrage (Baron et al., 2005).

5.3 La désinfection :

Les désinfections chimique, thermique, et thermochimique sont les trois méthodes pouvant être appliquées sur les dispositifs médicaux. Le choix de la (ou des) technique(s) à utiliser, adaptée(s) au générateur est indiqué par les fabricants en. Le fabricant peut proposer plusieurs méthodes pour un même appareil : désinfection thermique ou thermochimique et désinfection chimique réalisée avec différents produits désinfectants (**Baron et al., 2005**).

- **La désinfection chimique des générateurs de dialyse :**

Est réalisée à l'aide de différentes molécules, également employées pour le traitement de la boucle de distribution d'eau pour hémodialyse :

- Acide peracétique
- Hypochlorite de sodium
- Dérivés aldéhydiques

Après la désinfection chimique, le rinçage s'effectue à l'eau pour hémodialyse et doit éliminer toute trace de désinfectant. Il est impératif de réaliser, à l'issue de la désinfection et après la phase rinçage, un test permettant de vérifier que le taux résiduel de désinfectant dans le circuit hydraulique est inférieur au seuil susceptible d'entraîner une toxicité (**Baron et al., 2005**).

- **Désinfection thermique :** Certains générateurs sont conçus pour être désinfectés par la chaleur. Deux méthodes peuvent être utilisées : la circulation d'eau dont la température dans les circuits est supérieure 85 °C, ou l'utilisation de vapeur d'eau à 121 °C avec une pression de 1,5 bar. Les fabricants préconisent des couples temps/température variables selon les générateurs.

Les paramètres appliqués sont, à titre d'exemple : 90° C - 25 min ; 85 °C - 15 min ; 93 C - 40 min ; 125 C - 20 min ; 121 °C - 30 min.

L'efficacité antimicrobienne, sur les micro-organismes végétatifs, de températures supérieures à 65 °C a déjà largement été démontrée. En revanche, il n'existe pas à l'heure actuelle de consensus quant au couple temps/température à appliquer pour atteindre un niveau de désinfection intermédiaire (**Baron et al., 2005**).

- **Traitement thermochimique :** Le traitement thermochimique consiste à associer l'action d'un produit chimique (détartrant et/ou désinfectant) à celle de la chaleur.

Plusieurs associations sont préconisées par les fabricants selon les générateurs, par exemple :

- acide citrique et une température supérieure à 80 °C ;
- acide hydroxyacétique et une température de 85 °C (**Baron et al, 2005**).

Matériel et méthodes

1. Lieu d'étude :

Durant une période allant du 23/05/2013 au 18/06/2013 au niveau du service de néphrologie au CHU de Tlemcen, Des prélèvements d'eau de quatre machines de dialyse (trois anciennes datant de 2007 et une de 2011) ont fait l'objet de notre travail.

2. Les prélèvements :

Le premier prélèvement a été prélevé tout juste après l'osmose inverse afin d'évaluer la qualité de l'eau de dialyse.

Le deuxième prélèvement a été prélevé à partir de la boucle de distribution d'eau vers toutes les machines après avoir subit le traitement et passer par une longue tubulure.

Les autres prélèvements ont été prélevés à partir de différents générateurs :

- quatre prélèvements de chaque générateur, entrée et sortie de l'eau du générateur avant désinfection et entrée et sortie de l'eau après désinfection de la machine.

Ces prélèvements ont été mit dans des flacons stériles et transportés directement au laboratoire

- Deux prélèvements par écouvillonnage ont été réalisés au niveau des tubulures d'entrée et de sortie de chaque machine de dialyse.

3. Ensemencement :

3.1 L'eau de dialyse :

Un volume de 100ml d'eau de différents prélèvements, mit dans des flacons stériles a été filtré avec un dispositif de filtration, à travers des filtres de 0,22 μ m (**figure 4**).

Les filtres retirés sont tout de suite déposés sur une gélose nutritive et incubés à 37°C pendant 24h dans le but de réaliser un dénombrement.

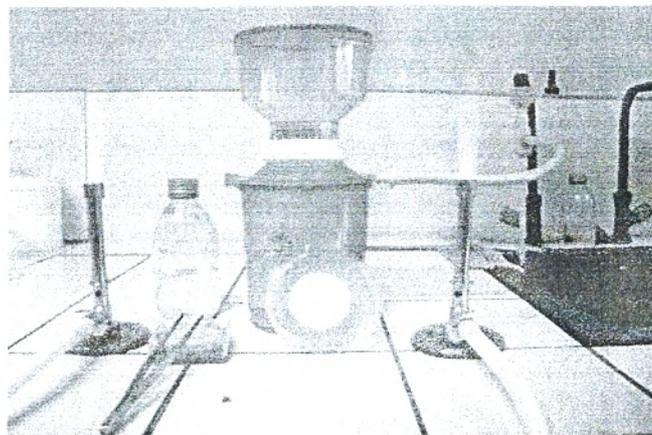


Figure 4: dispositif de filtration.

Après une incubation de 24h et à partir de géloses nutritives positives, des colonies ont été ensemencées sur Mac-Conkey pour l'isolement des bactéries gram négatif et sur Chapman pour l'isolement des bactéries gram positif.

3.2 Les écouvillons :

Les écouvillons (prélèvement au niveau des tubulures) ont été mis dans des tubes contenant 5ml du BHIB stérile et incubés à 37°C pendant 24h.

4/ Isolement et purification :

Après incubation des milieux ensemencés, on procède, à la purification des colonies bactériennes par ré isolement afin d'obtenir des souches pures à identifier.

5/ Identification :

Pour l'identification des souches, on a utilisé trois méthodes

- Galerie API20E
- Galerie API staph
- Test de coagulasse

5.1 Identification par galerie API20E :

La galerie API20E est un système standardisé pour l'identification des Enterobacteriaceae et autre bacilles à gram négatif, utilisant 20 testes biochimiques miniaturisés ainsi qu'une base de données spécifique. Ce système comporte 20cupules tests qui contiennent un milieu réactionnel déshydraté.

Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

5.1.1 Technique :

✓ Préparation de la galerie :

- réunir le fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir de l'eau dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide ;
- déposer stérilement la galerie dans la boîtes d'incubation ;
- inscrire la référence de la souche sur la languette latérale de la galerie.

✓ Préparation de l'inoculum :

Faire une suspension bactérienne dans un tube d'eau distillée stérile, d'opacité légère avec une seule colonie prélevée sur un milieu gélosé dans 5ml d'eau distillée.

✓ Inoculation de la galerie :

- homogénéiser la suspension bactérienne ;
- pour les tests CIT, VP, GEL remplir tubes et cupules ;
- pour les autres tests, remplir uniquement les tubes ;
- recouvrir les tests ODC, ADH, LDC, H₂S, UREE, avec deux gouttes d'huile de Paraffine ;
- mettre le couvercle de la galerie ;
- incuber a 37°C pendant 18 à 24 heures.

5.1.2 Lecture et interprétation :

Après incubation, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au tableau de lecture.

5.2 Identification par galerie API Staph :

La galerie API Staph est un système standardisé pour l'identification des Staphylocoques à gram positif, utilisant 20 testes biochimiques miniaturisés ainsi qu'une base de données spécifique. Ce système comporte 20cupules tests qui contiennent un milieu réactionnel déshydraté.

Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

5.2.1 Technique :**✓ Préparation de la galerie :**

- réunir le fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir de l'eau dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide ;
- déposer stérilement la galerie dans la boîtes d'incubation ;
- inscrire la référence de la souche sur la languette latérale de la galerie.

✓ Préparation de l'inoculum :

Faire une suspension bactérienne avec une seule colonie prélevée sur un milieu gélosé et la mettre dans le tube de l'inoculum spécial au staph.

✓ Inoculation de la galerie :

- homogénéiser la suspension bactérienne ;
- Remplir uniquement les tubes ;
- ajouter les réactifs VP et NITATE dans les deux tubes
- mettre le couvercle de la galerie ;
- incuber a 37°C pendant 18 à 24 heures.

5.2.2 Lecture et interprétation :

Après incubation, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au tableau de lecture.

5.3 Test de coagulase :

Pour la recherche du test de coagulase, 500 microlitres de la suspension bactérienne est ajoutée a un même volume de plasma de lapin. La réaction positive se traduit par la formation d'un caillot.

6. Evaluation de la formation de biofilm :

Pour cette étape, nous avons utilisés deux méthodes :

- Méthode de plaque de culture de tissus (TCP)
- Méthode du rouge Congo.

6.1 Méthode de plaque de culture de tissus (TCP) :

Le test TCP décrit par **Christensen et al., 1985** permet une évaluation semi quantitative de la formation du biofilm (**Mathur et al.,2006**).

6.1.1 Technique :

A partir d'une boîte de culture de 24h, ensemercer une colonie dans 10ml de bouillon de BHIB supplémenté de 2% de saccharose puis incuber a 37°C pendant 18h ;

Effectuer une dilution aux 1/100 avec un milieu frais (BHIB) et remplir les puits d'une plaque de 96 puits avec 0.2ml de cette dilution ainsi que 0.2ml de bouillon de culture (BHIB) qui servira de témoin stérile.

Les microplaques sont ensuite incubées pendant 18h à 37°C. Une fois que le contenu de chaque puits soit enlevé délicatement en tapotant la plaque, les puits sont lavés quatre fois avec 0.2ml de tampon phosphate salin (PBS pH 7.2) afin d'éliminer les bactéries libres flottantes. Les biofilms formés par l'adhérence des organismes sessiles dans la plaque sont

fixés avec l'acétate de sodium (2%) pendant 15 minutes et colorés avec du cristal violet (0,1% p / V) pendant 5 minutes. L'excès de colorant est ensuite rincé par un lavage en profondeur avec de l'eau distillée, et les plaques sont laissées pour le séchage afin d'évaluer l'importance de la coloration du biofilm (Stepanovic *et al.*, 2000)

6.1.2 Lecture :

Les souches sont classées dans les catégories suivantes :

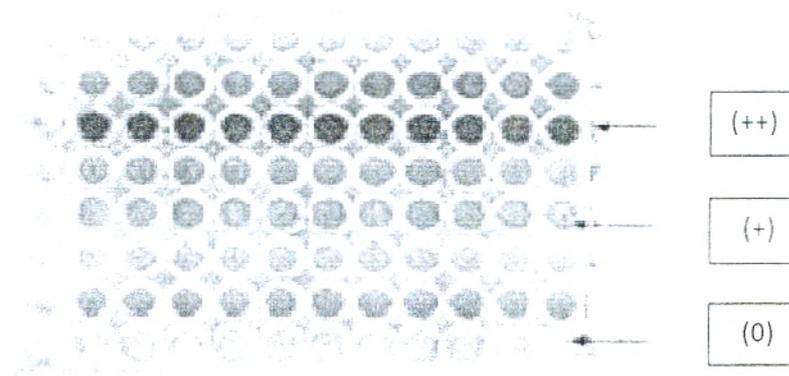


Figure 5 : Dépistage des producteurs de biofilm par la méthode TCP

(0) : Non-adhérentes.

(+) : Faiblement.

(++) : Fortement adhérentes.

6.2 La méthode du rouge Congo :

La gélose rouge Congo est un milieu très convenable pour la détection de souches productrices de slime. Sur ce milieu, les souches exprimant le PIA (polysaccharide intercellular adhesin) donnent des colonies noires avec une surface rugueuse contre des colonies noires avec une surface rugueuse contre des colonies de couleur rouge et à surface lisse pour les surfaces rugueuse contre des colonies de couleur rouge et à surface lisse pour les souches PIA négatif (Ziebuhr *et al.*, 2001).

6.2.1 Technique :

La production de slime a été recherchée sur le milieu rouge Congo. Ce milieu a été préparé en additionnant 0.8g de rouge Congo et 36 g de saccharose à 1L de gélose cœur-cervelle, puis autoclavé à 115°C pendant 10 minutes.

Le milieu estensemencé avec une anse d'une suspension de notre souche (une colonie dans 20 ml d'eau distillée). La lecture a été faite après une nuit d'incubation à 37°C et 24h supplémentaires à température ambiante (**Touati et al., 2007**).

6.2.2 Lecture :

Les souches productrices de slime donnaient des colonies noires à surface rugueuse contre des colonies rouge, à surface lisse pour les souches non productrices. Les souches de phénotype a variable donnaient des colonies a centre noir et à contour rouge ou à centre rouge et à contour noir.

7. Evaluation de l'efficacité de l'agent désinfectant sur le biofilm :

Le produit utilisé dans la procédure de désinfection des générateurs au service de néphrologie est l' « oxy-aniolyse » dont le composant actif est l'acide péracétique (1%) et de peroxyde d'oxygène. Ce désinfectant est fourni dans des bidons de 5L prêt a l'emploi pour usage professionnel, la dilution est faite automatiquement au 1/33^{ème}, lors du cycle de désinfection automatique. Temps de contact optimum : 15min. en suivant les recommandations du fournisseur.

Pour cette évaluation seules les souches formatrices de biofilm ont été sélectionnées.

Après formation de biofilm (technique décrite ci-dessus) et après incubation, les microplaques de 96 puits ont été rincées et placées en contact avec différentes concentrations du désinfectant.

Les microplaques ont été laissées à température ambiante pendant le temps de contact recommandé par le fournisseur qui normalement de 15min.

Parallèlement d'autres essais ont été réalisés avec différentes concentrations du désinfectant : désinfectant pure, désinfectant dilué au 1/33 (selon les recommandations du fournisseur) et une concentration au 1/100.

Le désinfectant est ensuite éliminé et rincé par l'eau distillée stérile et les puits étaient remplis de cristal violet à 0.5% pendant 15min à température ambiante puis rincés trois fois à l'eau distillée stérile.

Après la lecture des DO à 590nm des différentes concentrations (pur, 1/33 et 1/100) nous les avons comparés avec la DO du biofilm non traité par le désinfectant.

Résultats et discussion

VI- résultats et discussion

I. Niveau de contamination :

Au cours de notre période d'étude, l'analyse bactériologique de l'eau des trois machines datant de 2007 de dialyse étudiées, était non conforme aux normes microbiologiques, du fait que le nombre de bactéries retrouvées et dénombrées sur milieu gélosé dépassait de très loin le taux de conformité requis par la réglementation en vigueur (tapis bactérien sur filtre) (**figure 6**). Contrairement à la machine réceptionnée en 2011 où le dénombrement était de 78 UFC/ml et donc conforme. Selon Deux organismes principaux, Il s'agit de la « Pharmacopée Européenne » et de l' « Association for the Advancement of Medical Instrumentation (AAMI) » dont la principale recommandation est d'avoir un nombre bactérien inférieur à 100 UFC/ml (**Boubaker et al., 2002**)

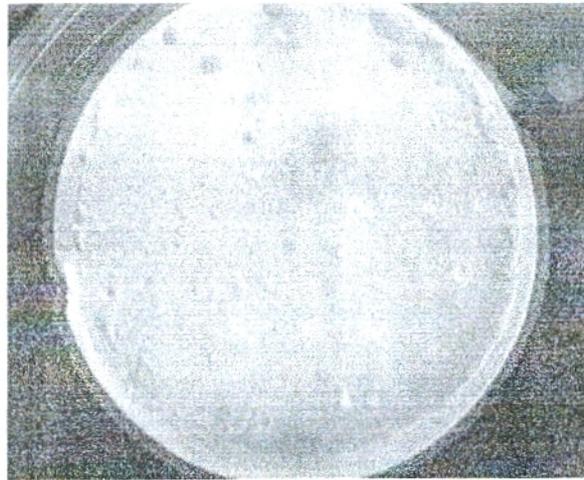


Figure 6 : un tapis bactérien sur le filtre

Sur l'ensemble des prélèvements effectués sur les quatre machines de dialyse, plusieurs micro-organismes dits à risque nosocomial majeur, sont identifiés et sont présentés dans le **tableau 5**. Il faut noter que certaines souches isolées n'ont pas pu être identifiées.

Tableau 5 : nombres de souches identifiées

Souche identifiées	Nombre
<i>Staphylococcus aureus</i>	11
<i>Staphylococcus warneri</i>	5
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	6
Staphylocoques blanc	13
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11
<i>Photobacterium damsela</i>	8
<i>Pseudomonas putida</i>	3
<i>Klebsiella pneumoniae</i> spp	5
<i>Aeromonas hydrophila</i>	2
<i>Citrobacter koseri</i>	5
<i>Citrobacter freundii</i>	3
<i>Enterobacter cloacae</i>	8
<i>Yersinia enterocolitica</i>	2
<i>Pasteurella pneumotropica</i>	2
<i>Cedecea davisae</i>	4
<i>Burkholderia cepacia</i>	1
<i>Shewanella putrescens</i>	1

Au niveau des quatre machines de dialyse étudiées, les Staphylocoques, les entérocoques, et les pseudomonas étaient les bactéries les plus souvent rencontrées.

2. État de contamination de l'eau de dialyse :

2.1 Avant entrée à la machine de dialyse (après traitement) :

L'eau potable est stockée dans des réservoirs à l'extérieur du service, cette eau passe par une tubulure pour arriver à la salle dépuration, ou elle passe par quatre étapes d'épuration et de traitement :

- Les filtres à particules
- L'adoucisseur d'eau.
- Filtres granulaires à charbon actif
- L'osmose inverse

Malgré son passage par toutes les étapes d'épuration pré citées, l'analyse bactériologique de l'eau de dialyse a révélé une contamination par différentes souches bactériennes

- ✓ *Photobacterium damsela*
- ✓ *Citrobacter koseri*
- ✓ *Citrobacter freundii*
- ✓ *Enterobacter cloacae*
- ✓ *Yarsinia enterolitica*
- ✓ Staphylocoques blanc

Les différents procédés qui interviennent dans le traitement de l'eau peuvent être eux même à l'origine de prolifération microbienne. Les filtres à charbon, les adoucisseurs sont de véritables niches écologiques et doivent donc faire l'objet de procédures d'entretien, de nettoyage et de désinfection (Duki et al., 2005)

Une température élevée de la pièce où se trouve l'installation est également un facteur favorisant la croissance bactérienne (Brooks et al., 2002)

2.2 avant désinfection de la machine de dialyse :

L'analyse bactériologique de l'eau des quatre machines de dialyse avant désinfection a révélé des contaminations importantes et la présence de germes indicateurs de pollution et souvent impliqués dans des infections nosocomiales. Ces bactéries sont indiquées dans le **tableau 6**.

Tableau 6 : les souches bactériennes retrouvées avant la désinfection.

Machine	année	L'eau d'Entrée Avant désinfection	L'eau de sortie Avant désinfection
Machine 1	2007	- <i>Citrobacter koseri</i> - <i>Shewanella putrefaciens</i> - <i>Citrobacter freundii</i> - <i>Photobacteriem damsela</i> - <i>Staphylococcus blanc</i> - <i>Pseudomonas aeruginosa</i> - <i>Pseudomonas putida</i>	- <i>Citrobacter koseri</i> - <i>Citrobacter freundii</i> <i>Pseudomonas putida</i> - <i>Burkholderia capacia</i> - <i>Photobacterium damsela</i> - <i>Citrobacter koseri</i> - <i>Staphylococcus blanc</i> - <i>Aeromonas hydrophila</i>

Machine 2	2007	- <i>Cedaceae davisae</i>	- <i>Staphylococcus warneri</i>
		- <i>Klebsiella pneumonia spp</i>	- <i>Cedaceae davisae</i>
		- <i>Enterobacter cloacae</i>	- <i>Klebsiella pneumonia spp</i>
		- Staphylocoques blancs	- <i>Photobacterium damsela</i>
		- <i>Staphylococcus aureus</i>	- Staphylocoques blancs
Machine 3	2007	- <i>Citrobacter koseri</i>	- <i>Aeromonas hydrophila</i>
		- <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	- <i>Pasteurella pneumotipic</i>
		- <i>Photobacterium damsela</i>	- <i>Staphylococcus warneri</i>
		- <i>Staphylococcus warneri</i>	- <i>Staphylococcus aureus</i>
		- <i>Staphylococcus aureus</i>	
Machine 4	2011	- <i>Enterobacter cloacae</i>	- <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
		- <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	- <i>Enterobacter cloacae</i>
		- <i>Cedaceae davisae</i>	- <i>Staphylococcus aureus</i>
		- <i>Staphylococcus aureus</i>	

L'analyse microbiologique de l'eau des machines étudiées et selon le tableau 6, a révélé une très grande diversité microbienne à l'entrée ainsi qu'à la sortie des machines avec la présence de bactéries d'origine hydrique tels les genres *Citrobacter*, *Enterobacter* (coliformes), *Photobacterium*, *Burkholderia* et des bactéries à caractère hospitalier et souvent responsables de putréfaction et d'infection nosocomiales tes les espèces à Gram négatif : *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Shewanella putrefaciens*, *Klebsiella pneumonia* et des bactéries à Gram positif très impliquées dans les infections en hémodialyse : Staphylocoque blanc et doré

Certains auteurs font une distinction entre infections « transmises » par l'eau et « associées » à l'eau. Les premières sont considérées comme telles car l'eau est le véhicule de l'agent infectieux ou parasitaire et le moyen principal de sa transmission.

Il faut noter que le rôle joué par l'eau dans la transmission de certains agents a été parfois surestimé. Les principales infections d'origine hydrique et des agents responsables sont *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter koseri*, *Citrobacter freundii*. (Hartemann, 2004).

D'autres sources potentielles de contamination existent dans les unités d'hémodialyse sans pour autant être spécifiques de la pratique de l'épuration extra-rénale. Ainsi ont été décrites des épidémies de bactériémies associées à une contamination des solutions antiseptiques et/ou des médicaments administrés au cours ou au décours de l'hémodialyse. Il s'agit alors le plus souvent de germes rarement isolés en microbiologie clinique (*Serratia*, *Burkholderia*) et en principe peu pathogènes la très grande majorité des cas la contamination est secondaire au non-respect de règles d'hygiène simples ou des consignes des laboratoires pharmaceutiques (**Baron et al., 2005**).

Selon l'étude de **Baron et al., 2005**, les cocci à Gram + sont les plus fréquents, en particulier *Staphylococcus aureus* et *S.epidermidis*. Parmi les bacilles à Gram négatif, il retrouve surtout des entérobactéries, et rarement des *Pseudomonas* et des *Acinetobacter* dans une eau de dialyse.

L'eau transporte les microorganismes (bactéries, virus et champignon) à la machine de dialyse, ces microorganismes sont produit sur la surface intérieure lors des traitements d'eau de dialyse du côté propre de la membrane d'osmose inverse, passant par une tuyauterie, et conduisant sur les machines de dialyse qui sont eux-mêmes responsable de la croissance bactérienne (**Nystrand, 2008**).

2.3. Après désinfection de la machine de dialyse :

Même après une désinfection, on note la persistance d'une grande variété de souches bactériennes à l'entrée et à la sortie de chaque machine avec une légère disparition de quelques bactéries d'origine hydrique (**tableau 7**).

Tableau 7 : les souches bactériennes retrouvées après la désinfection

Machine	année	L'eau d'Entrée	L'eau de sortie
Machine 1	2007	- <i>Photobacterium damsela</i>	- <i>Photobacterium damsela</i>
		-Staphylocoques blanc	- <i>Enterobacter cloacae</i>
		- <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-Staphylocoques blanc
Machine 2	2007	- <i>Klebsiella pneumoniae</i>	- <i>Klebsiella pneumoniae</i>
		-Stapylocoques blanc	-Stapylocoques blanc
		- <i>Staphylococcus aureus</i>	- <i>Staphylococcus aureus</i>

Machine 3	2007	- <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	- <i>Pasteurella pneumotopic</i>
		- <i>Staphylococcus warneri</i>	- <i>Staphylococcus warneri</i>
		- <i>Staphylococcus epidermidis</i>	- <i>Staphylococcus epidermidis</i>
Machine 4	2011	- <i>Enterobacter cloacae</i>	- <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
		- <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	- <i>Enterobacter cloacae</i>
		- <i>Cedaceae davisae</i>	- <i>Staphylococcus epidermidis</i>
		- <i>Staphylococcus aureus</i>	

La présence des germes (>100 UFC/ml) d'une part, et la persistance de bactéries nosocomiales et hospitalière d'autre part peuvent témoigner que les procédures de traitement et de désinfection sont inadaptées ou défectives.

Pour une séances de dialyse, environ 60 % des épisodes de bactériémie sont causées par des cocci Gram-positif (*Staphylococcus aureus* ou *S. epidermidis*) et 40 % par des bacilles Gram-négatif. en premier lieu *Escherichia coli* (Baron et al., 2005).

Nos résultats concordent avec les résultats de Briat et al., 2010, où les germes en cause étaient des Cocci à Gram + (61.1% *Staphylococcus aureus* 31.0%, *S. epidermidis* 14.2%), et des Entérobactéries (30.1% *E. coli* : 14,2%, *Enterobacter cloacae* 2.6%).

La contamination récurrente par *P. aeruginosa* de l'eau alimentant le circuit d'eau démontre l'effet pervers d'un système de désinfection mal entretenu. Lors de la réalisation de la désinfection, le désinfectant est injecté via une pompe de circulation, qui après utilisation reste installé sur le piquage. Il en résulte une stagnation de la solution désinfectante dans la pompe et au niveau du raccord, propice à la prolifération microbienne (Ducki et al., 2005).

Il s'agit ici non pas d'une contamination des éléments du dispositif de traitement d'eau mais d'une contamination secondaire à une maintenance inadaptée du système d'injection du désinfectant (Ducki, 2005).

2.4 Par écouvionllange dans les tubulures de la machine de dialyse :

En dernier lieu, des prélèvements réalisés par écouvionllages de chaque tubulure au niveau des quatre machines (la tubulure d'entrée et de sortie de l'eau de dialyse) ont donné les résultats représentés dans le **tableau 8**.

Tableau 8 : les souches bactériennes retrouvées par écouvillonnage

Machine	Année	Entrée écouvillon	Sortie écouvillon
1	2007	- <i>Yersinia enterocoliticae</i>	- <i>Potobacterium damsela</i>
		- <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	- <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
		- <i>Staphylococcus aureus</i>	- <i>Staphylococcus aureus</i>
		- <i>Staphylococcus epidermidis</i>	
2	2007	- <i>Klebsiella pneumoniae</i>	- staphylocoques blanc
		- <i>Staphylococcus blanc</i>	
3	2007	- <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	- <i>Enterobacter cloacae</i>
		-Stahpylocoques blanc	- Stahpylocoques blanc
4	2011	- <i>Pseudomonas putida</i>	- <i>Staphylococcus epidermidis</i>
		- <i>Staphylococcus epidermidis</i>	

A travers ce tableau, nous constatons que plusieurs bactéries déjà retrouvées et isolées de l'eau de dialyse, se retrouvent adhérentes et fixées sur les parois des tubulures.

Parmi eux *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et *S. epidermidis* qui sont les plus dominantes et quasi permanentes, ce même résultat a été déjà retrouvé par **Ducki, 2005**.

La contamination du dialysat peut être à l'origine du développement d'un biofilm à l'intérieur du circuit hydraulique. Des études anciennes réalisées sur des tuyaux de différents types de générateurs ont montré la présence de biofilm dont l'épaisseur pouvait atteindre 10 microns et dont la concentration en bactéries et endotoxines atteignait respectivement 10⁶ bactéries/cm² (**Baron et al., 2005**).

La persistance de ces deux bactéries après désinfection et surtout à l'entrée, à la sortie et au niveau de la tubulure nous laisse penser à la formation de biofilm par ces deux bactéries et sa résistance aux désinfectants.

3. Détection des souches formatrices de biofilm :

Les souches choisies pour ces tests sont les souches retrouvées avant et après désinfection et dans la tubulure des machines de dialyse. Les souches sont :

- 2souches de *Pseudomonas aeruginosa*
- 1souche d' *Aeromonas hydrophila*
- 1souche de *Citrobacter koseri*
- 1souche d' *Enterobacter cloacae*
- 4souches de *Staphylococcus aureus*
- 2souches de *Staphylococcus warnerri*
- 1souche de *Staphylococcus epidermidis*.

3.1 Par la technique du rouge Congo agar :

Sur l'ensemble des 12 souches choisies, seules 7souches de staphylocoques ont produits un slime avec des colonies noires et en conséquence formatrices de biofilm (**figure7**).

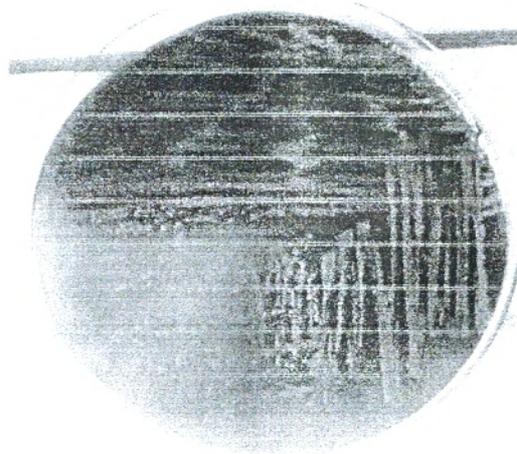


Figure 7 : Staphylocoque sur le milieu rouge congo

3. 2 par la méthode de plaque de culture de tissus (TCP) :

Cette méthode quantitative permet d'évaluer la capacité des souches bactériennes à former des biofilms en fonction des DO. Les résultats obtenus pour les souches a Gram négatif sont présentés dans la **figure 8**.

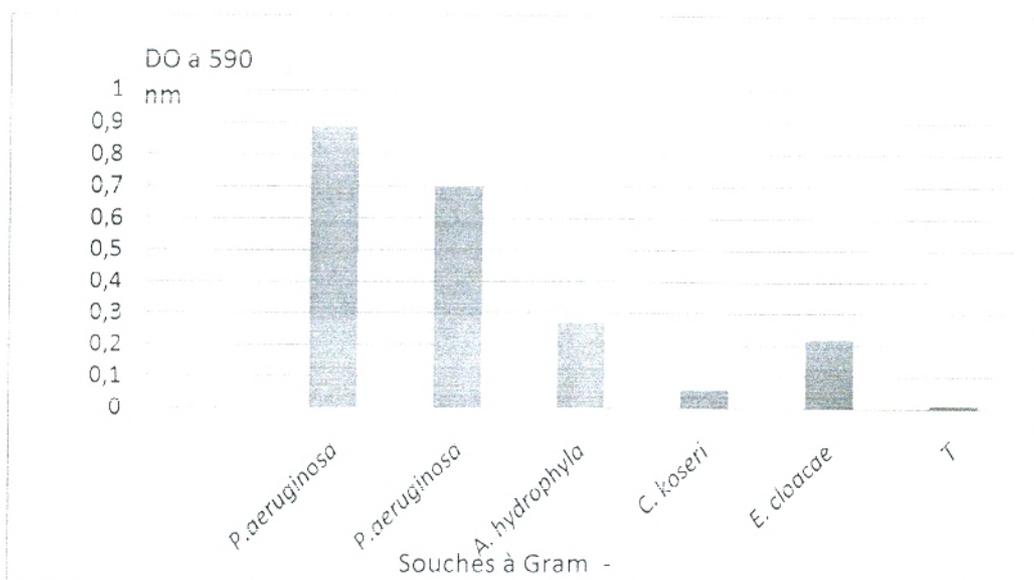


Figure 8 : les DO des souches à Gram Négatif testées

D'après les résultats obtenus on a remarqué que les deux souches de *Pseudomonas aeruginosa* présentent une forte capacité de former le biofilm avec DO entre 0,7 et 0,89 ($DO \times 4 \leq DO$).

Aeromonas hydrophyla et *Enterobacter cloacae* sont des souches considérées productrices modérées avec une DO comprise entre 0,27 et 0,22, contrairement à la souche *Citrobacter koseri* qui ne forme pas de biofilm.

Pour les résultats des bactéries à Gram positif ils sont représentés sur la figure 9.

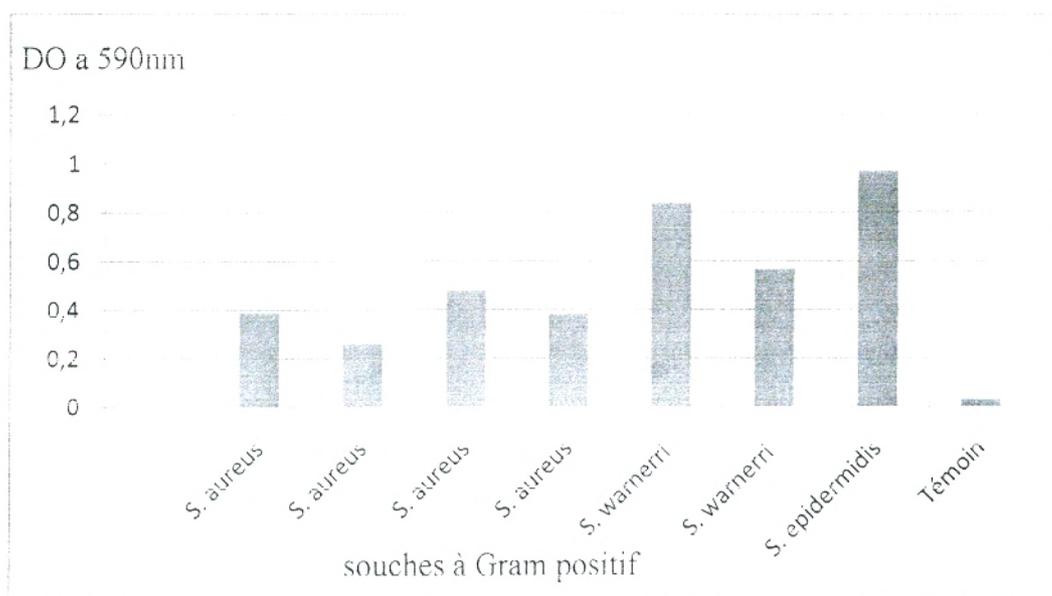


Figure 9 : les DO des souches à Gram positif testées

Selon la figure 7 toutes les souches de staphylocoques testées sont formatrices de biofilm. On constate que les Staphylocoques dorés sont moins plus au moins formatrices que les Staphylocoques blancs, ou la souche *Staphylococcus epidermidis* a montré la plus forte capacité à former le biofilm avec une DO de 0,97.

4. Evaluation de l'efficacité de l'agent désinfectant sur le biofilm :

Pour ce test, deux souches ont été sélectionnées, pour leur grande aptitude à former un biofilm : une souche *Pseudomonas aeruginosa* et une souche *Staphylococcus epidermidis*.

Tableau 9 : Effet de l'acide péraétique sur la formation de biofilm

	0,46	0,39	0,42	0,46
	0,56	0,36	0,37	0,50

Les bonnes pratiques de la désinfection sont souvent mises en défaut par la présence d'agrégats de microorganismes et de biofilm fréquemment observés dans les environnements hydriques (Block et al., 1990).

La désinfection des générateurs de dialyse s'inscrit dans le cadre général du traitement des dispositifs médicaux. Elle contribue à assurer la sécurité des patients et du personnel vis-à-vis du risque infectieux en hémodialyse (Ducki et al., 2005).

La désinfection des machines de dialyse au service se fait le plus souvent par un désinfectant à base d'acide péraétique à une concentration de (1/33), pendant 15min.

Le tableau 10 montre que la DO du biofilm traité par la concentration utilisée au service et recommandé par le fournisseur (1/33) a diminué légèrement par rapporta la DO du biofilm

temoin (sans désinfectant). La concentration du désinfectant au 1/100 a permis de baisser la DO a une valeur identique a celle du temoin et donc inefficace.

Seules des concentrations pures du désinfectant pendant 15minutes étaient suffisantes pour faire baisser les DO des biofilms.

Conclusion

Les biofilms sont répartis de façon ubiquitaire dans l'environnement, il n'y a pratiquement pas de surface qui ne puisse être peuplée de micro-organismes.

En effet, la biocontamination des surfaces reste un problème d'actualité dans de nombreux secteurs d'application et en particulier dans le domaine médical, notamment dans les machines de dialyse où le biofilm est omniprésent ce qui nécessite des opérations de désinfection après chaque séance.

Nos résultats ont confirmés la contamination de l'eau de toutes les machines de dialyse étudiées, que cette contamination est due essentiellement à des bactéries dites à risque nosocomiales et formatrices de biofilm. La désinfection avec l'acide péracétique n'a pas eu d'effet sur le biofilm.

Prévenir la formation de biofilm nécessite donc une bonne connaissance des modes de fixation des bactéries et de son développement. On peut lutter contre les biofilms par deux moyens soit en empêchant leur installation, soit en les éliminant lorsqu'ils sont en place.

Cependant ces différentes méthodes de prévention ne sont pas totalement satisfaisantes. Dans ce cas il faut penser à éviter l'adhésion bactérienne, avant que les bactéries ne s'adhèrent aux équipements et posent un problème à son élimination.

Références bibliographiques

Abdelaziz.D, Hermelin-Jobet, Martin.P. 2000. Conception d'une installation de production d'eau pour hémodialyse. Élaboration d'un système qualité Retour d'expérience (1e partie). éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS. , supp 21 : 164-89.

Baron.R, Bourzeix De Larouziere, Dumartin.C. 2005. Bonne pratique d'hygiène en hémodialyse, chapitre 6. Recommandation de la SFHH. Volume XIII - N° 2.

Bilodeau VK . 2007. L'insuffisance rénale.
http://cpoq.org/pathologies/fichiers/Insuffisance_renale.pdf.

Boubaker. K, Blanc. E, Troillet. N, Sion. 2002. Prévention des infections en hémodialyse. Première partie : qualité de l'eau. Swiss-noso. Volume 9 No 2.

Block J.C, Mathieu .L, Dollard.M.A, Jourdan Laforte.E. 1990. Effet de l'acide péraacétique sur des bactéries en suspension et fixées. Journal français d'hydrologie. 21 : p 101-111.

Briat C, Caillette B.A, Chanliau. J, et al. 2010. Indicateurs nationaux du tableau de bord Infections Nosocomiales pour le suivi des Établissements de santé, rapport final du groupe d'experts concernant l'hémodialyse, centre de Coordination de la Lutte contre les Infections Nosocomiales Inter-région Sud-est. 83pages.

Brooks S, Walczak M, Hameed R, Coonan P. Chlorhexidine. 2002. Resistance in antibiotic-resistant bacteria isolated from the surfaces of dispensers of soap containing chlorhexidine. Infect Control Hosp Epidemiol :23 (11) : p 692-5.

Chistensen GD,Simpson WA, Younger JA, Baddour LM, Barrett FF, Melton DM, et al.1985. Adherence of coagulase negative staphylococci to plastic tissue cultures : a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. J Clin microbiol. 22 : p 996-1006.

Donadey A, Legallais C, De Fremont JF. 1998. Equipements d'hémodialyse dans le traitement d'épuration extrarénale, elsevier, Paris. le cahier technique, RBM News, supp 20 : p 6.

Dorez DH, Soule H. 2009. L'eau de dialyse en réanimation. Société de réanimation de langue française. Publié par Elsevier Masson SAS. Réanimation supp 18 : p 407- 412.

Ducki S, Francini N, Blech MF. 2005. Circuit de traitement d'eau pour hémodialyse mais où se cache le Bacille pyocyanique?. Elsevier SAS et Association Société de Néphrologie. supp 1 : 126–130.

Frenkian GA, Ragon A, Donadey A. 1996. L'importance de la qualité de l'eau dans le traitement par hémodialyse de l'insuffisance rénale chronique. Elsevier paris. supp 18 : p 25-28.

Gambro. 2010. Mesure de la pureté de l'eau de dialyse, fiche technique, gambro lundia AB, HCFR . 2069 : p 1-8.

Gambro. 2010. Comment assurer la pureté du liquide de dialyse lors du remplacement de votre système de traitement de l'eau pour hémodialyse. fiche technique, gambro lundia AB, HCFR 1157 : p 1-16.

Harteman P. 2004. Contamination des eaux en milieu professionnel (Water contamination in working place). Elsevier EMC-Toxicologie Pathologie. p 63–78.

Hoarau M. 2011. La dialyse ou, quand, comment ?. Dossier spécial dialyse, éditorial, Reins-Échos n°10, p 60.

Jacquet S, Ricard C, Thomas C. 1999. Problématique des endotoxines en dialyse dans le milieu médical, synthèse bibliographique. ISIM – Secrétariat S.T.E, université Montpellier, p 2-10.

Jacquet A, Cueff C, Memain N, Pallot, et al. 2005. Progrès réalisés et à venir de l'hémodialyse intermittente. Société de réanimation de langue française. Publié par Elsevier SAS, Réanimation supp 14, p 539–550.

Kammoun. Hayet. 2011. Traitement des générateurs en hémodialyse, XIIème Journée Régionale d'Hygiène et de Sécurité des Soins de Bizerte. p 24.

Ledebo I. 2010. La chaîne d'hygiène. fiche technique. gambro lundia AB, HCFR1156_3, p 16.

Mathur T, Singhal S, Khan S, Upadhyay DJ, Fatma T, Rattan A. 2006. Detection of biofilm formation among the clinical isolates of staphylococci : an evaluation of three different screening methods. Indian journal of medical microbiology. 24 (1) : p 9-25.

Maurizi-Balzan J, Zaoui P. 2005. L'insuffisance rénale chronique (235), Corpus Médical – Faculté de Médecine de Grenoble, Alpesmed. p 6.

Morin.P. 2000. Identification of the bacteriological contamination of a water treatment line used for haemodialysis and its disinfection, Journal of Hospital Infection. supp 45: p 218–224.

Nesa- Eoha.D. 2007. Hémodialyse et risqué infectieux. Rapport de stage reanimation polyvalente.

Nystrand Rolf. 2008. Microbiology of Water and Fluids for Hemodialysis. Review article, Elsevier. All rightsreserved Vol 71 • No 5.

Sautou V. 2011. Qualité microbiologique et endotoxique de l'eau d'alimentation des générateurs. association des techniciens. 20ème session national de formation, p 6.

Sautou-Mirand V, Gellis C, Dehaese O et al. 2000. Etude comparative de produits désinfectants pour générateurs d'hémodialyse, journal de pharmacie clinique, volume 19. N°3, p 199-205.

Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, Savic B, Vlahovic M S. 2000. A modified microtiter-plate test for quatification of staphylococcal biofilm formation. Journal of microbiological methods. 40 : p 175-179.

Tong Mattew Ka-Hang, Wang Wei, Kwan Tze-Hoi, et al. 2001. Water treatment for hemodialysis. Hong Kong Journal of Nephrol : supp 3(1) : p 7-14.

Touati A, Achour W, Ben hassen A. 2007. Détection des gènes ica et de la production de slime parmi des souches de *Staphylococcus epidermidis* isolées d'infection liées aux cathéters chez des patients neutropéniques. *Pathologie biologique*, 55 : p 277- 282.

Résumé :

Toute séance d'hémodialyse peut exposer le patient au risque infectieux via l'abord vasculaire ou via une contamination du dialysat. Sur les quatre machines de dialyse étudiées, une large gamme de micro-organismes potentiellement pathogènes a été trouvée (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas hydrophila*, *Pasteurella pneumotropica*, *Klebsiella pneumoniae* spp *ozaenae*.). En étudiant leurs capacités à former le biofilm, le *Pseudomonas aeruginosa* et les *Staphylococcus epidermidis* ont montré une forte adhésion bactérienne révélée par deux techniques (RCA et TCA). *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus epidermidis*, sont les deux souches avec les DO les élevées et qui ont été testées pour l'évaluation de l'efficacité du désinfectant (acide péraacétique pure, dilué 1/33 et 1/100 pendant 15min). Nos résultats ont montré que, la désinfection avec l'acide péraacétique n'a pas d'effet sur le biofilm.

Summary :

All hemodialysis may expose the patient to the risk of infection via the vascular or via contamination of dialysate. Of the four dialysis machines studied a wide range of potentially pathogenic micro-organisms was found (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas hydrophila*, *pneumotropica Pasteurella*, *Klebsiella pneumoniae ozaenae* spp.). By studying their ability to form biofilm, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus epidermidis* showed high bacterial adhesion revealed by both techniques (RCA and TCA). *Staphylococcus epidermidis* and *Pseudomonas aeruginosa* are the two strains with the high DO and which were tested to evaluate the efficacy of the disinfectant (peracetic acid diluted 1/33 pendant 15min) was performed on the concentration of the disinfectant, but biofilm still persisted.

الملخص :

كل حصة غسيل كلّي قد يتعرض المريض لخطر العدوى عن طريق الأوعية الدموية أو عن طريق النلوث من ديالة. من مجموع آلات غسيل الكلّي الأربع التي تمت دراستها مجموعة واسعة من الكائنات الحية الدقيقة الممرضة تم الكشف عنها (المكورات العنقودية الذهبية، المكورات العنقودية البشرية، الزائفة الزنجارية، الكلبسيلا الرئوية spp الخشمية).

الزائفة الزنجارية و المكورات العنقودية البشرية أظهرت قدرتها على تشكيل بيوفيلم والقدرة العالية على الالتصاق كشفت بمختلف التقنيات (المكورات العنقودية الذهبية، المكورات العنقودية البشرية، الزائفة الزنجارية، الغازية hydrophila pneumotropica الباستوريلا، الكلبسيلا الرئوية الخشمية SPP من خلال دراسة قدرتها على تشكيل بيوفيلم، أظهرت الزائفة الزنجارية والبشرية Staphylococcus التصاق البكتيريا العالية التي كشفت عنها كل التقنيات (RCA و TCA). حمض البيروكسي المخفف 33/1 باندانت والتي تم اختبارها لتقييم فعالية مظهر 15 Staphylococcus البشرية والزائفة الزنجارية هي سلالتين مع ارتفاع القيام به، أجريت على تركيز مظهر، ولكن بيوفيلم لا تزال قائمة