



UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES – FES
DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE



PROJET DE FIN D'ETUDES

Licence en Sciences & Techniques :
Biologie & Santé

*Prévention de l'infection en
endoscopie*

Présenté par : TAILOULOUE Fatima

Encadré par :

Pr. Bouchra OUMOUKHTAR

Pr. Najoua BEN CHEMSI

Soutenu le : 13 Juin 2013

Devant le jury composé de :

- Pr. Najoua BEN CHEMSI
- Pr. Bouchra OUMOUKHTAR
- Pr. El Abida KAOUAKIB

Présidente
Encadrante
Examinatrice

Année Universitaire : 2012-2013

Dédicace

*A mes chers parents
Dont le rêve était toujours de me voir
réussir. Qu'ils sachent que leur place dans mon cœur et ma
pensée, reste et demeure immense.*

*A mon adorable mari
La perle de mon existence, pour son amour et son appui affectif.*

*A mes chers frères et ma chère sœur
Je vous aime beaucoup*

A toute ma grande famille et mes amis.

A mes professeurs de la FST

A tous ceux qui m'aiment

Je dédie ce travail

Remerciements

La réalisation de ce rapport n'a été possible que grâce à DIEU et à la contribution de plusieurs personnes que je remercie infiniment :

- ✚ Mon encadrante, Pr OUMOKHTAR BOUCHRA, Pour vos conseils et votre promptitude à avoir accepté notre demande d'encadrement. Vos encouragements m'ont été d'un grand secours dans l'accomplissement de ce travail.*
- ✚ Mon encadrante, Mme BENCHEMSI NAJOUA, pour l'aide et l'attention inestimable que vous m'avez apportée.*
- ✚ A mon professeur, ELABIDA KAOUAKIB fidèle à vos cours, vous nous faites le grand honneur de juger ce travail que, j'espère, sera à la hauteur de vos attentes.*
- ✚ Notre chef de Licence, ABDELALI TAZI, veuillez trouver dans ce rapport L'expression de notre gratitude pour les efforts considérables que vous avez déployés pour la réussite de notre formation.*

Liste des tableaux et figures

Tableaux :

Tableau1 : classement des dispositifs médicaux et niveau de traitement requis dans le cadre des activités d'endoscopie.....9

Tableau2 : aide de l'interprétation des résultats pour la surveillance microbiologique des endoscopes (les valeurs sont données à titre indicatif.....13

Tableau3 : dénombrement de la flore mésophile aérobie totale et les différentes bactéries présentes sur les endoscopes prélevés.....25

Figures :

Figure1 : gastroscopie.....6

Figure2 : bronchoscopie.....6

Figure3 : la machine à laver et à désinfecter des endoscopes.....10

Figure4 : prélèvement à l'aide d'une seringue stérile.....17

Liste des abréviations

CHU	:	Centre Hospitalier Universitaire.
CLIN	:	Comités de Lutte contre les Infections Nosocomiale.
CCLIN	:	Centre de Coordination de la Lutte contre les Infections Nosocomiales
UFC	:	Unité Formant Colonie.
LDE	:	Laveur Désinfecteur de l'Endoscope.
PCA	:	Plate Count Aga
LPS	:	Lipopolysaccharides.
FMAT	:	Flore Mésophile Aérobie Totale.
EMB	:	Eosine Bleu de Méthylène.

Sommaire

Introduction.....	1
Partie bibliographique.....	2
I.les infections associées aux soins.....	3
I.1. Définition	3
I.2. types d'infections.....	3
I.3. Diverses infections nosocomiales.....	3
I.4.Gravité des infections nosocomiales.....	3
I.5. Facteurs favorisant les infections Nosocomiales.....	4
I.6. les infections nosocomiales et leur impact à l'échelle mondiale.....	4
II. Dispositif mis en place pour la lutte contre les infections nosocomiales.....	5
II.1. Le modèle français.....	5
II.2. Au Maroc.....	5
III. Risques infectieux en endoscopie.....	6
III.1. les endoscopes	6
III.2.cas de l'endoscopie digestive.....	8
III.3. cas de l'endoscopie bronchique.....	8
III.4.Prévention du risque infectieux en endoscopie.....	8
III.5. Endoscope et infection nosocomiale.....	8
III.6.Clasement des endoscopes parmi les dispositifs médicaux et niveau de traitement requis	9
VI. Assurance qualité en endoscopie.....	10
IV.1.Procédure de désinfection.....	10
IV.2.Audit.....	12
IV.3. contrôle microbiologique.....	12
IV.4.Traçabilité	14
Matériel et méthode.....	15
I. Audit.....	16
II. Contrôle microbiologique.....	16

II.1.Prélèvement.....	16
II.2.Condition de prélèvement.....	16
Résultat et discussion.....	22
I. Audit.....	23
II. Contrôle microbiologique.....	24
Conclusion.....	27
Référence bibliographique.....	28
Résumé.....	30

Introduction

L'endoscopie est une méthode d'exploration et d'imagerie médicale ou industrielle qui permet de visualiser l'intérieur de conduits ou de cavités inaccessibles à l'œil.

Cependant, si l'endoscopie présente de nombreux avantages pour le patient, elle n'est pas un acte dépourvu de risques. Pendant leur stockage et surtout au moment de leur utilisation, les endoscopes et leurs accessoires subissent une contamination microbiologique majorant le risque de transmission d'une infection.

La transmission d'infection par le biais d'endoscopes ne peut être maîtrisée que par un traitement rigoureux du matériel. Si les endoscopes rigides peuvent faire l'objet d'une stérilisation ; opération qui permet d'éliminer tous les micro-organismes et les spores, les endoscopes souples, du fait de leur complexité et notamment de la sensibilité à la chaleur de certains de leurs constituants, ne peuvent supporter qu'une désinfection, qui est une opération au résultat momentané limité aux micro-organismes présents au moment de l'opération.

Dans ce travail, réalisé au sein du Centre Hospitalier Hassan II, au service des explorations fonctionnelles, nous avons effectué des contrôles microbiologiques sur des endoscopes digestifs. Ces contrôles qui s'intègrent dans la démarche qualité appliquée à l'endoscope, ont pour objectif l'évaluation de l'efficacité des procédures de nettoyage et de désinfection des endoscopes utilisées dans le service

Partie
bibliographique

I. les infections associées aux soins

I.1. Définition

Les infections associées aux soins appelés aussi les infections nosocomiales sont définies comme les accidents infectieux contractés par les malades au cours de l'hospitalisation. Un délai de 3 jours minimum est nécessaire pour éliminer les infections en période d'incubation au moment de l'hospitalisation. Les infections nosocomiales sont dues à de très nombreux micro-organismes, incluant bactéries, champignons, parasites et virus. (1)

I.2. types d'infections

- **Les infections endogènes** : le malade s'infecte avec ses propres microorganismes, à la faveur d'un acte invasif et/ou en raison d'une fragilité particulière
- **Les infections exogènes** : les microorganismes ont pour origine les autres malades (transmission croisée entre malades ou par les mains ou matériels des personnels), les personnels ou la contamination de l'environnement hospitalier (eau, air, équipements, alimentation ...) (1)

I.3. Diverses infections nosocomiales

On peut distinguer les infections nosocomiales d'origine bactérienne en fonction de leur localisation primitive. Les infections urinaires sont de loin les plus fréquentes, puisqu'elles peuvent représenter près de 30 à 40 p. 100 des infections nosocomiales. Puis viennent les infections post-opératoires et pulmonaires, les infections à localisations diverses (peau, péritoine, tube digestif, cerveau...), et enfin les bactériémies souvent induites par cathétérisme vasculaire. (1)

I.4.Gravité des infections nosocomiales

Toutes les infections n'ont pas la même gravité. Cette gravité dépend, d'une part de l'état du patient et d'autre part, de la virulence de l'agent infectieux. Plus le patient est fragilisé, plus l'infection sera grave. (2)

I.5. Facteurs favorisant les infections Nosocomiales

La survenue d'une infection nosocomiale est favorisée par la situation médicale du patient qui dépend de :

- **Son âge et sa pathologie** : sont particulièrement réceptifs les personnes âgées, les personnes immunodéprimées, les nouveau-nés, en particulier les prématurés, les polytraumatisés et les grands brûlés
- **Certains traitements** : qui déséquilibrent la flore bactérienne des patients et sélectionnent les bactéries résistantes ; (antibiotiques, traitements immunosuppresseurs)
- **La réalisation d'actes invasifs nécessaires au traitement du patient** : sondage urinaire, pose d'un cathéter, ventilation artificielle ou intervention chirurgicale (2)

I.6. les infections nosocomiales et leur impact à l'échelle mondiale

A tout instant, 1,4 million de personnes sont malades dans le monde des suites d'infections contractées en milieu hospitalier. Dans les pays développés, elles touchent 5% à 10% des patients. Dans certains pays en développement, il arrive que près d'un quart des patients soient touchés. (3)

La lutte contre les infections nosocomiales constitue de ce fait, un élément fondamental, de la politique d'amélioration de la sécurité et de la qualité de soins, de tout établissement de santé. Les pays développés en ont fait l'une des priorités et ont développé pour la majorité, une politique appuyé sur programme de lutte.

Dans les pays en voie de développement (les pays africains en particuliers), la lutte contre les infections nosocomiales est loin d'être effective. D'une part, qu'il y'a un vide juridique en la matière. D'autre part, parce que les mesures adoptées par les pays occidentaux nécessitent un équipement complexe, performant qui est économiquement hors d'accès pour ces pays. Dans ce contexte de pénurie, les différentes mesures adoptées doivent être adaptable aux besoins de chaque pays. (4)

II. Dispositif mis en place pour la lutte contre les infections nosocomiales

II.1. Le modèle français

En France, un dispositif spécifique visant à organiser la lutte contre les infections nosocomiales au niveau local, régional et national a été créé. Ce dispositif est constitué de Comités de Lutte contre les Infections Nosocomiales (CLIN) dans les établissements publics de santé. Pour soutenir l'action de ces instances hospitalières, des structures interrégionales (les Centres de Coordination de la Lutte contre les Infections Nosocomiales, CLIN) et nationale (Comité Technique et Cellule Infections Nosocomiales de la direction générale de la santé et de la direction de l'hospitalisation des soins) de coordination et de conseil ont été créés en 1992 et 1995

Pour la surveillance, un partenariat entre les 5 C.CLINs et l'Institut de Veille Sanitaire l'InVS a permis de créer le Réseau d'Alerte d'Investigation et de Surveillance des infections Nosocomiales (RAISIN) qui coordonne les réseaux de surveillance et l'investigation des alertes de dimension nationale. Enfin, le dispositif de signalement des infections nosocomiales est en place depuis juillet 2001 (Programme National de Lutte contre les Infections Nosocomiales 2005-2008, Ministère de la Santé et de la Protection Sociale, France)

Les premiers résultats de la 4^{ème} enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales, organisée par RAISIN (Enquête de prévalence nationale 2001-Résultats Institut de Veille Sanitaire ; 2003), ont été présentés à la mi-janvier 2007 ; la conclusion préliminaire est double : réduction modérée de la prévalence des patients infectés par rapport à l'enquête de 2001, soit 4%, mais réduction notable et encourageante de la prévalence des patients infectés par *staphylococcus aureus* résistant à la pénicilline (SARM) soit 38%.

(Prévalence des infections nosocomiales en France, 2007).

II.2. Au Maroc

Au Maroc, la prise de conscience de l'importance et de la gravité des infections nosocomiales est plus récente.

Le Maroc a enregistré un retard en matière de surveillance et de prévention des infections nosocomiales. Une enquête de prévalence à l'échelon national, a été réalisée en 1994.

Les résultats de cette enquête indiquaient que le taux de prévalence moyen de l'infection nosocomiale, dans le secteur hospitalier, était de 5% dans hôpitaux provinciaux, 10% dans les hôpitaux régionaux et plus de 11% dans les centres hospitaliers universitaires (5)

La principale recommandation formulée, à la suite de cette enquête, est l'importance de l'élaboration et de la mise en place d'une stratégie nationale d'hygiène hospitalière.

Toutefois, à l'exception des circulaires relatives à la protection des transfusés et à la gestion des déchets hospitaliers, le domaine d'hygiène hospitalier souffre encore d'un vide juridique.

Une étude a été réalisée en 2007 au CHU Hassan II, a révélé que le taux de prévalence des infections nosocomiales dans les trois hôpitaux est de 6,7% (5)

III. Risques infectieux en endoscopie

III.1. les endoscopes



Figure1 : gastroscope



Figure2 : bronchoscope

Les endoscopes possédant des canaux sont des dispositifs médicaux complexes constitués par l'assemblage de plusieurs dizaines de pièces en matériaux divers. Ils présentent des canaux internes en nombre variable, pouvant atteindre plus d'un mètre de longueur et de diamètre interne de l'ordre du millimètre, reliés les uns aux autres par des jonctions créant des anfractuosités et des circuits préférentiels.

L'ensemble est rassemblé dans une chemise interne opaque. Leur conception est également très variable d'un fabricant à l'autre, d'un type d'endoscope à l'autre et d'un modèle à l'autre

Il existe deux types d'endoscope :

- **Les endoscopes rigides** : Ils sont formés d'un tube métallique de 5 à 8 mm de diamètre et de 15 à 30 cm de longueur. Ils sont utilisés pour l'exploration des : articulation (arthroscopie), de la vessie (cystoscopie), de la cavité abdominale (laparoscopie),
- **Les endoscopes souples** : Ils sont plus longs que les endoscopes rigides et permettent d'explorer des organes tels que les bronches, l'œsophage, l'estomac, le duodénum ou le côlon

La complexité de leur structure rend possible une accumulation de souillures organiques (liquides biologiques ou tissus) ou minérales (dépôts de calcium ou de magnésium) en certains points, plus ou moins accessibles au nettoyage, à la désinfection et au séchage. Ces souillures peuvent elles-mêmes renfermer des agents infectieux et constituent des points d'ancrage des germes et des substrats favorables à la multiplication de micro-organismes. Une fréquence ou une qualité insuffisante de traitement peut aboutir à la formation d'un bio film. Les canaux des endoscopes constituent, par ailleurs, un obstacle au contrôle visuel de propreté habituellement effectué pour les dispositifs médicaux.

III.2.cas de l'endoscopie digestive

Les infections d'origine endogène s'expliquent par le fait que ces actes endoscopiques se déroulent dans un milieu septique riche d'une grande variété de micro-organismes et sont traumatiques au niveau des muqueuses à l'occasion de biopsies et de gestes thérapeutiques. Les données publiées par Nelson(17) montrent clairement que le risque infectieux dépend de deux paramètres : le type de geste endoscopique, interventionnel ou diagnostique, et l'organe examiné.

Ainsi, pour les endoscopies digestives hautes, le taux moyen de bactériémie après dilatation œsophagienne atteint 22,8% contre seulement 4,1% lors d'une simple biopsie. Pour les procédures plus invasives comme la cholangiographie rétrograde, le taux de bactériémie peut atteindre 26,5% en cas d'obstruction des voies biliaires.

Les micro-organismes isolés sont variés : *streptocoques*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* et *Pseudomonas aeruginosa* (6)

III.3. cas de l'endoscopie bronchique

La bronchoscopie fait partie des investigations invasives susceptibles d'entraîner des infections nosocomiales. Une revue de la littérature de langue anglaise publiée par Spach et col, en 1993(7) et recouvrant la période 1966-1992, a dénombré 96 infections liées à une bronchoscopie. *Pseudomonas aeruginosa* et *Mycobacterium sp.* Etaient les principaux micro-organismes identifiés. Les mêmes micro-organismes ont été incriminés dans la survenue de cas groupés d'infections au décours d'actes de bronchoscopie(8). Des publications plus récentes relatent des infections à *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Mycobacterium tuberculosis*, respectivement liés à un défaut de conception de la bronchoscope au niveau de l'orifice du canal à biopsie (9) ou à un test d'étanchéité non effectué. (10)

III.4.Prévention du risque infectieux en endoscopie

La prévention du risque infectieux en endoscopie doit être envisagée de manière globale et ne doit pas être réduite à la phase de désinfection des endoscopes. Elle repose dans le cadre d'un corpus réglementaire étayé par de nombreuses recommandations et publications, sur la prévention des infections d'origine endogène, des infections d'origine exogène (respect des bonnes pratiques d'hygiène en salle d'examen, nettoyage et désinfection des endoscopes) ainsi que la prévention des risques chez les professionnels réalisant les actes et assurant la désinfection du matériel (11)

III.5. Endoscope et infection nosocomiale

Les cas d'infection identifiés et publiés en relation avec un acte d'endoscopie digestive ou bronchique restent exceptionnels compte tenu du nombre important d'examens réalisés. Ce risque a été évalué par Nelson à 1,8 cas par million d'actes en endoscopie digestive. Le risque lié à l'endoscopie reste réel et ne doit en aucun cas être négligé.

Les microorganismes en cause peuvent avoir un double origine, endogène ou exogène :

- ❖ **Les microorganismes endogène**, c'est à dire ceux du patient, sont en provenance des cavités explorées (exemple : système digestif) ou des voies d'accès traversées par l'endoscope (exemple : arbre respiratoire supérieure). Leur présence est prévisible et inévitable ; elle justifie le traitement des endoscopes entre deux patients.
- ❖ **Les microorganismes exogènes** : proviennent de l'environnement, matériel et humain. Leur présence est anormale : elle peut être liée à un problème de conception des endoscopes, à un traitement inadapté (erreur de pratiques ou dysfonctionnement d'un procédé) ou à une contamination des machines ou des fluides de traitement (produits, eau de rinçage).

III.6. Classement des endoscopes parmi les dispositifs médicaux et niveau de traitement requis

Les endoscopes sont des dispositifs médicaux complexes non stérilisables. Le niveau de traitement requis d'un dispositif médical est déterminé en fonction de sa destination anatomique (tableau1) (12)

Tableau1 : classement des dispositifs médicaux et niveau de traitement requis dans le cadre des activités d'endoscopie (12)

Classement du matériel	Destination	Niveau de risque	Niveau de traitement requis
Critique	Introduit directement dans le système vasculaire ou dans une cavité stérile	Haut risque	Stérilisation A défaut désinfection de haut niveau
Semi critique	En contact avec muqueuse ou peau lésée superficiellement	Risque médian	Désinfection de niveau intermédiaire
Non critique	Ne touche pas le malade ou touche sa peau intact	Risque bas	Désinfection de bas niveau

IV. Assurance qualité en endoscopie

L'assurance qualité en endoscopie repose principalement sur les 4 éléments suivants :

- 1-Procédures de désinfection
- 2-Audits
- 3-Contrôle microbiologique
- 4-Traçabilité

IV.1.Procédure de désinfection

→ Procédure automatisée (annexe1)

- la procédure automatique consiste à utiliser un laveur désinfecteur d'endoscopes (LDE). Les LDE sont par définition des machines automatisées destinées à laver et à désinfecter les surfaces internes et externes des endoscopes souples non stérilisables selon un principe chimico-thermique.

De nombreuses études ont montré que le système de lavage automatisé précédé par une étape de prétraitement, de 1^{er} nettoyage, de 1^{er} rinçage et de 2^{ème} nettoyage



Figure3 : la machine à laver et à désinfecter des endoscopes

➔ Procédures manuelle

La désinfection manuelle des endoscopes est une méthode toujours utilisée. Elle doit être privilégiée en cas d'acte et/ou de patient et/ou de tissus à risque. Le traitement s'effectue en 10 étapes : si l'une des étapes n'est pas correctement exécutée, le résultat final sera compromis (**annexe3**).

1^{ère} étape : PRETRAITEMENT (EN SALLE D'EXAMEN) L'objectif de cette étape est d'éliminer les souillures

2^{ème} étape : TEST D'ETANCHEITE (EN SALLE DE DESINFECTION) La finalité de cette étape est de vérifier l'intégrité de la gaine externe de l'endoscope et de ses canaux.

3^{ème} étape : PREMIER NETTOYAGE (EN SALLE DE DESINFECTION)

Le temps global dédié au premier nettoyage ne doit pas être inférieur à 10 min.

A ce niveau, il s'agit d'abaisser le niveau de contamination de l'endoscope et d'éliminer les souillures.

4^{ème} étape : PREMIER RINÇAGE (EN SALLE DE DESINFECTION) L'objectif de cette étape est d'éliminer les salissures et les résidus de détergent

5^{ème} étape : SECOND NETTOYAGE (EN SALLE DE DESINFECTION)

Le temps dédié à cette phase de nettoyage ne doit pas être inférieur à 5 min

6^{ème} étape : DEUXIEME RINÇAGE (EN SALLE DE DESINFECTION)

Pour éliminer les salissures et les résidus de détergent

7^{ème} étape : DESINFECTION A FROID (EN SALLE DE DESINFECTION)

Cette étape à pour but de tuer les micro-organismes à fin d'éviter leur transmission

8^{ème} étape : RINÇAGE TERMINAL (EN SALLE DE DESINFECTION)

Le rinçage terminal vise à éliminer les résidus de détergent

9^{ème} étape : SECHAGE (EN SALLE DE DESINFECTION)

L'objectif de cette étape est d'éliminer l'eau de rinçage résiduelle

10^{ème} étape : STOCKAGE ET TRANSPORT (SALLE DE STOCKAGE)

Stocker l'endoscope digestif suspendu verticalement dans une armoire fermée

IV.2. Audit

Le but de l'audit est d'améliorer la qualité du traitement des endoscopes pour assurer la sécurité des patients. Les moyens pour atteindre ce but sont de mesurer le degré d'observance, par rapport aux recommandations en vigueur, des pratiques de prétraitement et d'écouvillonnage-brossage avant la mise en LDE.

IV.3. contrôle microbiologique

Le contrôle microbiologique des endoscopes s'intègre dans la démarche qualité à l'endoscopie au même titre que :

- L'élaboration des protocoles de traitement des endoscopes (nettoyage et désinfection) respectant les recommandations des fabricants et les recommandations officielles,
- L'application de ces procédures et leur évaluation par audit, équivalent à un contrôle de processus,
- La maintenance préventive et curative des endoscopes et équipements de traitement des endoscopes

Des critères d'interprétation à trois niveaux doivent être établis en tenant compte de la réglementation existante et des recommandations locales validées par le responsable du centre d'endoscopie et par le CLIN : niveau cible, niveau d'alerte et niveau d'action (14)

Le niveau cible : le niveau de qualité qui vise à assurer et à maintenir des conditions normales de fonctionnement et de sécurité dans le contexte d'un environnement maîtrisé. Ce niveau cible est également le niveau à respecter lors de la validation d'une procédure de traitement des endoscopes.

Lors des contrôles sur endoscopes nettoyés et désinfectés, une absence de micro-organismes indicateurs (*Staphylococcus aureus*, entérobactéries, *Pseudomonas aeruginosa*) est exigée et

un niveau cible est définie pour le dénombrement de la flore totale selon le type d'endoscopes en distinguant :

La désinfection de niveau intermédiaire avec rinçage soit à l'eau du réseau soit à l'eau bactériologiquement maîtrisée

La désinfection de haut niveau avec rinçage à l'eau stérile

Le niveau d'alerte : Ce niveau se situe entre le niveau cible et le niveau d'action, c'est le niveau permettant une première alerte en cas de dérive par rapport aux conditions normales. Il correspond à des valeurs encore acceptables en nombre de germes, nécessitant des mesures correctives sans arrêt d'utilisation de l'endoscope.

Le niveau d'action : C'est le niveau au-delà duquel il est estimé qu'il existe un risque infectieux potentiel pour les patients. Ce niveau doit impérativement déclencher une réaction immédiate avec arrêt de l'utilisation de l'endoscope, analyse des causes du dysfonctionnement et mise en œuvre d'actions correctives.

En l'absence de référence consensuelle, le tableau est fourni à titre indicatif pour aider à l'interprétation des résultats.

Tableau2 : aide de l'interprétation des résultats pour la surveillance microbiologique des endoscopes (les valeurs sont données à titre indicatif) (13)

Niveau de désinfection	Niveau cible	Niveau d'alerte	Niveau d'action
Désinfection de haut niveau et rinçage à l'eau stérile	Flore totale < 1UFC	-	Flore totale ≥ 1UFC Ou présence de micro-organismes indicateurs
Désinfection de niveau intermédiaire et rinçage à l'eau bactériologiquement maîtrisée	Flore totale < 5UFC Et absence de microorganismes indicateurs	Flore totale 5-25 UFC et absence de microorganismes indicateurs	Flore totale > 25 UFC ou présence de microorganismes indicateurs
Désinfection de niveau intermédiaire et rinçage à l'eau pour soins standard	Flore totale < 25 UFC et absence de microorganismes indicateurs	Flore totale 25-100 UFC et absence de microorganismes indicateurs	Flore totale > 100UFC ou présence de microorganismes indicateurs

IV.4. Traçabilité

La traçabilité est un élément essentiel du système qualité de l'endoscope. Elle correspond à l'aptitude à retrouver à distance l'historique (modalités de réalisation, acteurs et localisation) d'une endoscopie grâce à des enregistrements adéquats effectués en temps réel au moment de l'intervention et de l'entretien du matériel et consultables ultérieurement (**annexe4**).

MATÉRIEL
ET
METHODES

I. Audit

Nous avons réalisé un audit dans le service d'exploration fonctionnelle au sein du CHU Hassan II ; ce service est composé des plusieurs salles d'endoscopie en néphrologie, dermatologie, gastrologie et pneumologie. Il dispose également d'une salle de désinfection et d'une salle de stockage.

La salle de désinfection dispose de 3 endoscopes digestifs, 2 endoscopes bronchiques, 3 machines à laver et désinfecter, 3 tables TD20 pour les fibroscopes et les coloscopes, et une seule table pour les bronchoscopes. Le traitement des endoscopes est assuré par deux aides soignantes pour les fibroscopes et coloscopes, et une infirmière diplômée pour les bronchoscopes.

L'audit s'est déroulé pendant une journée de travail, sur les endoscopes préparés est de 6 fibroscopes, 4 coloscopes et 2 bronchoscopes. Pour le bon déroulement de cet audit, une grille (**annexe5**) a été construite à l'aide d'outils déjà existants (grille d'audit élaborée par le CCLIN sud-ouest 2007) et réadaptée au contexte local selon la procédure de désinfection en rigueur dans le service des explorations fonctionnelles.

L'évaluation s'est intéressée aux différentes de traitement des endoscopes: pré-désinfection, le 1^{er} et 2^{ème} nettoyage, la désinfection et les produits utilisés, ainsi que sur l'hygiène des mains à chacune des étapes de la procédure.

II. Contrôle microbiologique

II.1.Prélèvement

Nous avons réalisé 5 prélèvements sur 4 colonoscopes et 1 gastroscopie.

II.2.Conditions de prélèvement

→Moment de prélèvement

Les prélèvements sont établis en coordonnant avec les responsables de ces services soit juste après la désinfection, soit après 12h de stockage selon les objectifs visés à chaque étape.

Les mesures d'asepsie adapté (tenue vestimentaire, hygiène des mains ou port des gants, nettoyage –désinfection des plans de travail) sont respecté tout au long de la procédure de prélèvements

→Localisation des prélèvements

Nous avons effectué des prélèvements au niveau des canaux internes des endoscopes, du fait qu'ils constituent les surfaces de l'endoscope les plus vulnérables à la contamination et à la colonisation par les biofilms bactérien, et de ce fait peuvent constituer une source de contamination exogène aux patients.

→Solution de prélèvement

Nous avons utilisé l'eau physiologique qui composé de 9g de NaCl/l

→Technique de prélèvement

A l'aide d'une seringue stérile bien adaptée à l'orifice proximal du canal opérateur nous avons injecté 200 ml de la solution (eau physiologique)

Nous avons essayé de récupérer un volume très proche de celui injecté dans un flacon stérile et on a chassé le liquide avec de l'air à l'aide de la seringue

Les échantillons ont été prélevés dans des flacons stériles.



Figure4 : prélèvement à l'aide d'une seringue stérile

→Conservation des prélèvements jusqu'à l'analyse

Le prélèvement est transféré au laboratoire de microbiologie de la faculté de médecine dans un réfrigérateur maintenant l'échantillon à +4°C le plus rapidement possible.

→ Analyse des prélèvements

1°/ Technique d'analyse de la solution de prélèvement

Pour optimiser l'analyse, nous avons traité le liquide de recueil par la méthode de filtration sur membrane. Le volume total de liquide recueilli est filtré pour donner les résultats par endoscope

La membrane est ensuite transférée sur un milieu de culture non sélectif adapté type PCA (Plate Count Agar) et incubé à 37°C en aérobiose. La lecture est réalisée à 24h, 48h, 72h, et jusqu'à 5j en de culture stérile.

Les colonies dénombrées sont purifiées et ensemencé sur gélose nutritive pour une identification ultérieure.

Les résultats sont exprimés en unités formant colonies UFC par endoscope.

2°/ Dénombrement de la flore mésophile aérobique totale (FMAT)

Après incubation des membranes à 37°C, un dénombrement des colonies qui ont poussé sur le milieu PCA est effectué en 1^{er} lieu.

3°/ Identification des micro-organismes indicateurs à partir du PCA

Les résultats quantitatifs sont obtenus par le dénombrement de toutes colonies qui ont poussé sur ce milieu, les résultats qualitatifs sont obtenus par identification des différents types de colonies qui ont poussés sur ce milieu non sélectif.

→ Coloration de gram

***Principe**

C'est une coloration qui permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne, et d'utiliser ces propriétés pour les distinguer et les classifier. Ainsi les bactéries Gram Positif gardent la couleur violette à cause de la présence du lipopolysaccharides (LPS) dans leurs parois qui empêche l'entrée de l'alcool et son action de décoloration. A l'opposé des bactéries Gram Négatifs, l'absence de LPS dans leur parois ; laissent passer l'alcool prennent comme coloration finale le rose de fuschine.

Le but de cet examen est l'observation de la flore bactérienne afin d'orienter le choix du milieu d'isolement.

***Mode opératoire**

Un étalement aussi mince que possible est effectué à l'aide d'une anse sur une lame. La lame étalée est séchée à température ambiante, fixée par immersion avec l'alcool éthylique absolu pendant 30 secondes. La lame est recouverte totalement avec le violet de Gentiane entre 20 secondes à 1 minute à température ambiante. Un lavage sous un jet d'eau vient éliminer toute trace du violet de gentiane.

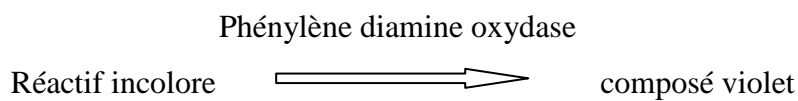
La lame est ensuite immergée dans le lugol et soumise à un deuxième lavage. Une décoloration à l'aide de l'alcool-acétone, jusqu'à disparition de la couleur violette pendant 5 à

10 secondes suit cette dernière étape de lugol. Ensuite ; la lame est rincée à l'eau, recouverte de la solution de fuschine pendant 30 secondes et rincé de nouveau avec de l'eau puis séchée entre deux feuilles de papier filtre ou à la chaleur sur platine chauffante.

→ Test d'oxydase

*Principe

C'est le premier test effectué qui permet de mettre en évidence la présence d'une enzyme : le phényle diamine oxydase des bactéries à partir de leur culture en milieu gélosé. Cette enzyme est capable d'oxyder un réactif : le N diméthyle paraphénylène diamine. Ce réactif incolore libère un composé rose rouge noircissant à l'air et en présence de l'enzyme phénylène diamine oxydase



Cette enzyme est commercialisée sous deux formes : en solution ou sous la forme d'un disque pré-imprégné.

*Mode opératoire

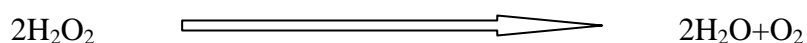
Un inoculum bactérien est écrasé sur un disque d'oxydase à l'aide d'une pipette Pasteur, le changement de coloration est observé.

Une oxydase positive se traduit par une coloration rose sur le disque (exemple : *Pseudomonas*). Dans le cas d'une oxydase négative le disque reste incolore (exemple : *Entérobactéries* et les *Acinetobacter*). Si le disque reste incolore : l'oxydase est négative et la bactérie n'a pas oxydé le réactif du disque. Il ne possède pas le cytochrome C.

→ Test catalase

*Principe

Cette enzyme est produite en abondance par les bactéries à métabolisme respiratoire qui peuvent détruire les peroxydes. La catalase est une enzyme qui catalyse la réaction suivante :



La plupart des microorganismes aérobies possèdent une catalase, particulièrement les bacilles Gram négatif. Le test de catalase est un important critère d'orientation et d'identification.

***Mode opératoire**

Sur une lame propre et sèche une goutte d'eau oxygénée est déposée, puis additionné d'un inoculum bactérien. L'apparition de bulles indique un dégagement gazeux de dioxygène et la bactérie possède une catalase positive.

→Milieu Kligler-Hajna

***Principe**

Le milieu Kligler-Hajna est un milieu gélosé complexe coulé en tube très utilisée pour l'identification des *Entérobactériaceae*.

La technique particulière d'ensemencement du milieu Kligler-Hajna permet de distinguer les phénomènes selon leur lieu, pente ou culot

Ainsi, les bactéries glucose négatif alcalinisent le milieu en utilisant les peptones et donnent une coloration rouge sur la pente et le culot.

Les bactéries glucose positif et lactose négatif acidifient le milieu dans un premier temps par utilisation du glucose. Ce glucose étant en faible concentration il sera rapidement épuisé. Les bactéries utilisent par la suite les peptones, ce qui conduit à une alcalinisation du milieu, cela se traduit par une coloration jaune du culot et rouge de la pente dans un premier temps, puis une recoloration du culot par le rouge suite à l'alcalinisation du milieu. Dans le culot l'utilisation de carbone est anaérobie.

Les principaux acides organiques produits sont volatils : ils restent enfermés dans le gélose.

Tandis que les bactéries glucose positif et lactose positif acidifient le milieu, ce qui se traduit par une coloration jaune aussi bien de la pente que du culot. Sur la pente l'utilisation de la source de carbone est aérobie si la capsule est correctement dévissée. Le principal acide produit est le dioxyde de carbone.

La présence de thiosulfate de sodium et de fer III dans ce milieu permet de révéler la capacité des bactéries à produire de l' H_2S à partir de thiosulfate. Cette production par la formation d'un précipité noir de fer

La production de bactérienne de gaz est un autre caractère qui peut être apprécié à l'aide de ce milieu se traduit par une dislocation de la gélose.

→Milieu citrate de Simmons

Le milieu citrate de Simmons est un milieu où le citrate est l'unique source de carbone.

L'utilisation de ce substrat pour la plupart des bactéries, est une utilisation aérobie. Elle se traduit par une alcalinisation du milieu. Ce milieu se présente sous forme de gélose incliné en tube (18 mm).

La pente est ensemencée par une strie longitudinale, réalisée à l'anse à partir d'une suspension bactérienne. Le bouchon n'est pas vissé à fond afin de permettre les échanges gazeux (en particulier élimination du dioxyde de carbone). Si l'indicateur de PH (bleu de bromothymol) vire au bleu : il y a eu alcalinisation du milieu et la souche est citrate de *Simmons* positif.

→ Milieu Chapman

Le milieu de Chapman est un milieu sélectif, surtout utilisé en microbiologie médicale, permettant la croissance des germes halophiles. Parmi ces germes figurent au premier rang les bactéries du genre *Staphylococcus*, mais aussi les *Micrococcus*, les *Enterococcus*, les *Bacillus*, et de rares bactéries à Gram négatif.

L'ensemencement doit être massif, en stries serrées ou par inondation. Ce milieu contient un inhibiteur : fortes concentrations en chlorure de sodium (75 g.L⁻¹), ce qui permet un isolement sélectif de *Staphylococcus* tolérant les fortes concentrations en Na Cl.

On peut étudier la fermentation du mannitol par virage au jaune de l'indicateur coloré, le rouge de phénol, autour des colonies.

Les colonies mannitol + sont entourées d'une auréole jaune.

Ne pas confondre la pigmentation des colonies et le virage de l'indicateur coloré.

Ainsi des colonies pigmentées en jaunes et mannitol + : forte suspicion de *S. aureus*.

→ Milieu EMB

Milieu Eosine Bleu de Méthylène.

Milieu d'isolement des bacilles Gram-.

Il est très utilisé pour l'isolement des coliformes.

Ce milieu contient deux colorants, l'éosine et le bleu de méthylène qui inhibent la majeure partie de la flore Gram+ (sauf *Streptocoques D*). Bien que les *Entérobactéries* lactose - puissent s'y développer, la culture des *Entérobactéries* lactose + y est favorisée.

Le milieu contient un critère de différenciation, le lactose.

Colonies violettes :

Semi-bombées de 2 à 3mm de diamètre avec éclat métallique, centre sombre : *E. coli* très bombées muqueuses de diamètre 5 mm centra gris marron sans reflet *Klebsiella*

Colonies grisâtres :

- 1 à 2 mm de diamètre transparent, grises ambrées : *Salmonella*, *Shigella*.

- 2 mm de diamètre, grisâtres avec une pellicule autour de la colonie : *Proteus morgani* punctiformes et grisâtres : *Enterococcus*.

*RESULTATS ET
DISCUSSION*

I. Audit

Nous avons réalisé un audit par l'observation directe des pratiques de traitement des endoscopes. Afin de vérifier auprès du personnel responsable de la désinfection la bonne application des procédures de désinfections des endoscopes digestifs et bronchiques. Les résultats interrogeaient sur la bonne réalisation des étapes manuelles et automatiques de ces procédures. L'évaluation s'est ainsi intéressée aux étapes suivantes:

- Pour le prétraitement (étape1) : toutes les étapes sont respectées à 100% sauf le transfert des endoscopes vers la salle de désinfection qui a été respecté à **66.66%** ; quatre endoscopes sont transportés à la main et non sur un plateau ou bac avec un couvercle .Cette étape c'est à dire le transfert des endoscopes vers la salle de désinfection ; est très critique vu que les endoscopes souillés peuvent contaminer l'environnement.

- **pour le 1^{er} nettoyage (2^{ème} étape)** : les observations ont mis en évidence un certain nombre de non conformité : ***test d'étanchéité (66.66%)** : est une étape essentielle qui permet de détecter une perforation interne ou externe des canaux ou de la gaine de l'endoscope. L'infiltration d'eau endommage l'instrument et implique la mise hors circuit immédiate de l'endoscope et sa révision par le fabricant.

***la dilution du détergent (91.66%)** : **ENZYMEX L9** est destiné au nettoyage et au pré désinfection des instruments chirurgicaux, des endoscopes souples ainsi que tous les dispositifs médicaux immergeables. Ce détergent a une concentration de 0.5%, il faut diluer une dose de 25 ml dans 5L d'eau. Si la dilution de ce détergent n'est pas respectée, il peut endommager l'endoscope. D'autant plus que l'efficacité antimicrobienne est diminuée ce qui pourrait constituer un risque sanitaire lié à l'utilisation des endoscopes d'un patient à l'autre.

- **la 3^{ème} étape concerne le 1^{er} rinçage**: le rinçage consiste à immerger l'endoscope dans l'eau. Les points de non conformités observés à cette étapes sont : *** l'immersion de l'endoscope à été fait à 91.66%**, un bronchoscope à été rincé directement sous le robinet.

*** le purge et l'irrigation de tous les canaux ont été effectuées à 83.33%** : sont deux étapes obligatoires qui permettent le rinçage correct des canaux et le dégagement de tout le liquide de nettoyage en envoyant de l'air dans tous les canaux.

- **pour le 2^{ème} nettoyage (4^{ème} étape)** : même observation que le 1^{er} nettoyage.

⇒ On a noté que 5 endoscopes ont été placés dans le LDE, et les sept endoscopes qui restent ont été suivies la procédure manuelle :

- **pour le 2^{ème} rinçage (5^{ème} étape) :** on a enregistré que l'irrigation et le purge des canaux ont été réalisée pour 5 endoscopes sur 7.

- **pour la désinfection (6^{ème} étape) :** c'est une étape obligatoire qui serve à éliminer ou tuer les micro-organismes pour éviter leur transmission. On a observé que **la validité du glutaraldéhyde** n'a pas été contrôlée.

Le contrôle de validité de la solution désinfectante peut être considéré comme suffisant pour établir la périodicité de renouvellement du bain.

-**pour le rinçage terminal (7^{ème} étape) :** on a noté que toutes les étapes ont été respectées à **100%** dans toute observation.

II. contrôle microbiologique

Les résultats des prélèvements microbiologiques des endoscopes sont présentés dans le tableau 4. Nous avons enregistré un niveau de qualité cible sur trois endoscopes, ce niveau vise à assurer et à maintenir des conditions normales de fonctionnement et de sécurité dans le contexte d'un environnement maîtrisé. Ce niveau cible est également le niveau à respecter lors de la validation d'une procédure de traitement des endoscopes. Nous avons des *Staphylococcus coagulas* négatif, mais la présence de ces bactéries n'est pas alarmantes puisqu'elles sont considérées comme des bactéries saprophytes commensales. Des erreurs lors du prélèvement peuvent également expliquer leur présence.

Un niveau d'alerte à été enregistré sur 2 endoscopes ; Ce niveau se situe entre le niveau cible et le niveau d'action, c'est le niveau permettant une première alerte en cas de dérive par rapport aux conditions normales. Il correspond à des valeurs encore acceptables en nombre de germes, nécessitant des mesures correctives sans arrêt d'utilisation de l'endoscope.

La présence de *Pseudomonas* n'est pas tolérée. En effet, des infections post-endoscopiques à *Pseudomonas* ont été rapportées dans différentes publications.

Pseudomonas aeruginosa est un microorganisme de l'environnement présent dans l'eau et dans toutes les zones humides. Il est la cause la plus fréquente des infections post-endoscopiques. Dans les établissements de soins, l'eau de rinçage des endoscopes, un laveur désinfecteur, des bacs ou des siphons colonisés peuvent être la cause de la contamination des

endoscopes. *Pseudomonas aeruginosa* se localise préférentiellement à l'intérieur des canaux des endoscopes et produit facilement des biofilms qui le protègent de l'action des désinfectants.

Tableau3 : dénombrement de la flore mésophile aérobie totale et les différentes bactéries présentes sur les endoscopes prélevés.

Endoscope	Dénombrement en UFC/endoscope	Bactéries isolées	Niveau de contamination
Fibroscope EG-250WR5	71	<i>Staphylocoque coagulase negative</i>	Alerte
Fibroscope EC-250 WM5 (A375)	0	--	Cible
Fibroscope EC-250WM5	74	<i>Pseudomonas sp.</i>	Alerte
Fibroscope EC -250 WM5	9	<i>Staphylocoque</i>	Cible
Fibroscope EC-250 WM5 (A375)	2	<i>Staphylocoque</i>	Cible

Les résultats de cet audit de pratiques inciteraient le personnel à améliorer la qualité de traitement des endoscopes afin d'assurer une sécurité maximale pour les patients. Les procédures de désinfection des endoscopes en vigueur dans le service des explorations fonctionnelles ont été éditées en 2010. Ces procédures devraient être actualisées et mises à jour. Dans ce contexte et en absence de réglementation nationale, nous avons réalisé une comparaison entre les recommandations internationales pour pouvoir rapprocher les divergences et aligner correctement nos procédures.

⇒ Plusieurs recommandations sont rédigées par les sociétés savantes et les autorités sanitaires. Des points de vue différents en fonction des pays ont aboutis à des avis parfois divergents.

→ **La France** : recommande les détergents non-enzymatiques car les détergents enzymatiques demandent au moins 15 minutes de contact pour être efficaces. Après le rinçage terminal, il y a le rinçage des canaux avec de l'alcool éthylique à 70–90% ou avec de l'alcool isopropylique.(15)

→ **Australie** : préconise le nettoyage des vannes et des boutons par le nettoyeur à ultrasons, le rinçage intermédiaire se fait avec de l'eau fraîche et le rinçage terminal se fait avec de l'eau douce.(16)

→ **Allemagne** : la désinfection se fait à l'aide du glutaraldéhyde et l'acide peracétique.

→ **Canada** : le nettoyage des surfaces extérieures de l'endoscope se fait à l'aide d'un chiffon doux ou d'une éponge à endoscope. Les brosses sont utilisées pour le nettoyage des canaux. Le tout dernier rinçage devrait être fait avec de l'eau stérile ou exempte de bactéries. Dans le cas d'utilisation de l'eau de robinet, il est ESSENTIEL de faire un rinçage avec de l'alcool à 70-90 % entre chaque usage chez un patient avant l'entreposage.

Conclusion

Pour répondre aux exigences de sécurité, la question de la procédure optimale de traitement du matériel d'endoscopie se pose d'autant plus aujourd'hui face à une résistance accrue des agents conventionnels aux modes de stérilisation et de désinfection habituels et à l'apparition de nouveaux agents pathogène plus agressifs.

Les résultats de cet audit de pratiques nous ont permis de relever les anomalies par rapport aux procédures en vigueur dans le service des explorations fonctionnelles. Par ailleurs, le prélèvement microbiologique a révélé également que deux des endoscopes analysés répondent à un niveau de qualité "alerte" avec présence *Pseudomonas*. Des mesures correctives devraient être appliquées.

Références bibliographiques

- (1) Patrick Berche, Jean-Louis Gaillard, Michel Simonet 1991 : Bactériologie « les bactéries des infections humaines »
- (2) Asmahan Filali 2010 : « Place des contrôles microbiologiques dans la politique assurance qualité en endoscopie »
- (3) Rapport de situation sur 22 pays participant à la campagne « A bonne hygiène, bons soins, soin propre et un soin plus sûr ; OMS 2006
- (4) VAN LEBERGHE W, DE BROUWERE V., 2000, « Etat de santé et, Santé de l'Etat en Afrique subsaharienne », in Afrique contemporaine, Numéro Spécial, la santé en Afrique Anciens et nouveaux défis, Paris, La documentation Française n° 195, Juillet-Septembre : 175-190
- (5) EL Rhazi, k. El fakir, S., Berraho, M., Tachfouti, N., Serhier, Z., C. Nejari, C. (2007). Prévalence et facteurs de risque des infections nosocomiales au CHU Hassan II de Fès (Maroc). La Revue de Santé de la Méditerranée Orientale, Vol. 13, No 1 ; 56-63
- (6) Nelson. DB(2003), infection disease complication of GI endoscopy : Part II, endogenous infections. Gastrointest Endosc, 57 : 695-711
- (7) Spach DH, Silverstein EE, Stamm W.E, (1993). Transmission of infection gastrointestinal endoscopy and bronchoscopy, Ann intern.Med.1993,2: 117-28
- (8) Center for Disease control and Prevention. Bronchoscopy-related infections and pseudo infections- New York, 1996 and 1998. MMWR Morb Mort Wkly, 1999, 48 : 557-560
- (9) Kirschke DL, Jones TF, Craig AS, Chu PS, Mayernick GG, Patel JA, Schaffner W. *Pseudomonas aeruginosa* and *Serratia marcescens* contamination associated with a manufacturing defect in bronchoscopes. N Engl J Med, 2003, 348: 214-20.

- (10) Ramsey AH, Oemig TV, Davis JP, Massey JP, Torok TJ. An outbreak of bronchoscopy-related *Mycobacterium tuberculosis* infections due to lack of bronchoscope leak testing. Chest, 2002, 121 : 976-81
- (11) Circulaire DHOS/E2/DGS/SD5C n° 2003-591 du 17 décembre 2003 relative aux modalités de traitement manuel pour la désinfection des endoscopes non autoclavables dans les lieux de soins.
- (12) La désinfection des endoscopes non autoclavables
- (13) Ministre de la santé et des solidarités DGS/DHOS, CNILS-France. Mars2007
- (14) Manuel de Procédure de la désinfection, Nettoyage des endoscopes souples, Juin 2011.
- (15) Désinfection des endoscopes – une approche tenant compte des ressources à disposition, février 2011, World Gastroenterology Organisation, 2011
- (16) Infection control in Endoscopy Third Edition 2010, Digestive Health Foundation, Reprint 2011.
- (17) Nelson DB. Infections disease complications of GI endoscopy: Part I, endogenous infections. Gastrointest Endosc, 2003, 57: 546-56

Résumé

En dépit des évolutions technologiques et des progrès observés en termes de traitement des dispositifs médicaux réutilisables, l'endoscopie reste un acte susceptible de pouvoir être à l'origine d'infections nosocomiales.

Le contrôle microbiologique des endoscopes s'intègre dans la démarche qualité appliquée à l'endoscopie. Il contribue à la validation de l'efficacité du traitement et au repérage d'une situation potentiellement à risque infectieux.

Pour évaluer l'efficacité de la procédure de désinfection des endoscopes digestif et bronchique du service d'exploration fonctionnelle, nous avons réalisé des prélèvements des canaux internes et des embouts d'endoscopes, nous avons aussi réalisé un audit pour assurer la sécurité des patients.

Afin d'améliorer le niveau de contamination des endoscopes et d'éliminer la présence des microorganismes à risque nosocomial majeur, nous avons modifié la procédure de désinfection des endoscopes digestif et bronchique du service d'exploration fonctionnelle. Le dénombrement de la flore mésophile aérobie totale et l'absence des microorganismes indicateurs nous a orientés vers un niveau cible.

Donc, le respect des règles de base de l'hygiène hospitalière, l'application de procédures de nettoyage et de désinfection rigoureuses, validées et régulièrement évaluées sont des éléments prépondérants dans la prévention et la lutte contre les infections post-endoscopiques.

