



**UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN
ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES**



**LICENCE SCIENCES ET TECHNIQUE
BIOPROCEDES HYGIENE ET SECURITE ALIMENTAIRE
PROJET DE FIN D'ETUDE**

Contrôle de la qualité microbiologique des eaux en milieu hospitalier à Fès

Laboratoire d'accueil: Laboratoire Régional de Diagnostic Epidémiologique et d'Hygiène du Milieu, Direction Régionale de la Santé Fès Boulmane, Fès

Présenté par: Nmer Samira

Encadré par:

- **Dr Zbadi Latifa**
- **Pr Ouhmidou Bouchra**

Soutenu Le 15 juin 2015 devant le jury composé de :

- **Pr Ouhmidou Bouchra : Présidente (F.S.T. Fès)**
- **Dr Zbadi Latifa : Encadrant (L.R.D.E.H.M. Fès)**
- **Pr Chadli : Examineur (FST Fès)**

Dédicaces

**À mes chers parents qui m'ont toujours apporté soutien,
encouragement et réconfort.**

**À ma chère famille, mes amis et spécialement mes intimes Lamiae et
Loubna.**

**À ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce
travail.**

À ceux qui vont assister à ma soutenance.

**À tous ceux connus ou inconnus qui vont feuilleter un jour ce
travail.**

Remerciements

Mes remerciements vont particulièrement à :

Docteur ZBADI Latifa, responsable de l'Unité Hygiène au Laboratoire Régional de Diagnostic Epidémiologique et d'Hygiène du Milieu à la Direction Régionale de la Santé Fès Boulemane à Fès d'avoir accepté de diriger ce travail de licence. Qu'elle reçoive ici l'expression de ma reconnaissance pour l'aide nécessaire qu'elle m'a procuré pour l'élaboration de ce mémoire. Mes vifs remerciements pour l'intérêt qu'elle a bien voulu m'accorder, pour ses conseils avisés, pour sa disponibilité tout au long de mon stage, pour son écoute active, et pour sa générosité, très touchée par sa gentillesse et ses qualités humaines

Professeur OUHMIDOU Bouchra à la faculté des Sciences et techniques de Fès. Je tiens à exprimer ma profonde gratitude ainsi que mes sincères remerciements, pour son aide, l'intérêt qu'elle a bien voulu m'accorder, le temps qu'il m'a consacré et ses précieux conseils.

Professeur CHADLI Nabil à la faculté des Sciences et techniques de Fès de m'avoir fait l'honneur d'examiner ce travail.

Mr CHADLI Abd El Aziz, responsable du bureau provincial d'hygiène du milieu à la Délégation de la Santé à Fès. Je le remercie pour ses efforts incessants pour réaliser les prélèvements de l'eau.

Tous le personnel de la santé à la région Fès-Boulemane notamment le personnel du Laboratoire Régional de Diagnostic Epidémiologique et d'Hygiène du Milieu de Fès.

Mes remerciements s'adressent aussi à mes camarades de stage pour leur collaboration, leur aide et leur gentillesse et à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.

Liste des Figures et Tableaux

Liste des figures

Fig. 1. Développement des coliformes dans un milieu Térigitol au TTC	13
Fig.2. Test indole positif reflétant la présence d' <i>E. coli</i> (formation d'un anneau rouge)	14
Fig. 3. Développement des entérocoques intestinaux dans le milieu Slanetz (colonies rouges brique)	15
Fig. 4. Développement de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> sur le milieu cétrimide	15

Liste des tableaux

Tableau.1. Spécifications des eaux d'alimentation humaine : Paramètres à effet sanitaire (NM 03.7.001)	12
Tableau 2 : Non-conformité globale des échantillons d'eau analysés	16
Tableau 3: Résultats de recherche des germes hydriques dans les échantillons d'eaux analysées	16

Liste des abréviations

ASR : Anaérobies sulfito-réducteurs

BEA : Bile Esculine Agar

CF : Coliformes Fécaux

CT : Coliformes Totaux

E .coli : *Escherichia coli*

EI : Entérocoques intestinaux

FMAT : Flore Mésophile Aérobie Totale.

LRDEHM : Laboratoire Régional De Diagnostic Epidémiologique et Hygiène du Milieu.

NM : Norme marocaine

P.aeruginosa : *Pseudomonas aeruginosa*

SPS : Sulfadiazine-polymyxine- sulfite

Sommaire

Résumé

Présentation du laboratoire

Introduction générale..... 1

Revue bibliographique

I. L'eau à l'hôpital 3

1. Disponibilité de l'eau à l'hôpital 3

1.1. Potabilité de l'eau 3

1.2. Eaux destinées à un usage alimentaire

1.2.1. Eau de distribution publique ou eau potable..... 3

1.2.2. Eau des fontaines réfrigérantes 4

1.2.3. Eau conditionnée..... 5

2. Consommation d'eau à l'hôpital 5

3- Risques infectieux liés aux eaux hospitalières 6

II. Les indicateurs de qualité bactériologique des eaux

1. Flore mésophile aérobie totale 22°C et à 37°C 7

2. Germes témoins de contamination fécale 7

2.1. Coliformes totaux 7

2.2. Coliformes fécaux 8

2.3. Entérocoques intestinaux (Streptocoques fécaux) 8

3. Spores de microorganismes anaérobies sulfite-réducteurs 9

4. *Pseudomonas aeruginosa* 10

Matériels et méthode

I. Lieu et période de stage 11

II. Matériel utilisé 11

III. Méthodes de contrôle de la qualité bactériologique de l'eau potable 11

1. Echantillonnage / 11

2. Prélèvement des échantillons d'eau 11

3. Techniques d'analyses utilisées pour le contrôle bactériologique de l'eau 12

3.1. Dénombrement de la flore mésophile aérobie totale à 22°C et 37°C 12

3.2. Dénombrement des germes témoins de contamination fécale 13

3.2.1. Coliformes totaux et fécaux	13
3.2.2. Entérocoques intestinaux	14
3.2.3. Spores de micro-organismes anaérobies sulfito-réducteurs	15
3.2.4. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15

Résultats et discussion

I. Qualité microbiologique des échantillons d'eau analysés	16
1. Evaluation de la non-conformité globale des échantillons d'eau analysés	16
2. Etude de la non-conformité selon les germes en cause	16

Conclusion générale	18
----------------------------------	----

Références bibliographiques	19
--	----

Annexes	21
----------------------	----

Résumé

L'eau est un élément essentiel au fonctionnement des établissements de santé. La distribution d'eau de bonne qualité hygiénique est nécessaire en permanence en milieu hospitalier pour prévenir la survenue des infections nosocomiales.

Pour évaluer la qualité bactériologique de l'eau de réseau hospitalière de la ville de Fès, une étude prospective du 15 avril au 30 mai au LRDEHM de Fès, a été réalisée.

Ainsi, 15 échantillons d'eau ont été analysés et les germes (Flore mésophile aérobie totale, Coliformes Totaux, coliformes fécaux, entérocoques intestinaux, ASR et *P. aeruginosa*) ont été dénombrés et interprétés selon la réglementation en vigueur.

Les résultats obtenus ont montré que tous les échantillons d'eau ont été conformes aux exigences de potabilité. Cependant, des contrôles périodiques pour s'assurer de la qualité hygiénique de l'eau distribuée dans les hôpitaux est nécessaire afin d'éviter l'apparition des infections d'origine hydrique.

Présentation du laboratoire d'accueil

Historique

En 1977, le ministre de la santé a créé des laboratoires « à visée préventive » : Les Laboratoires de Diagnostic Epidémiologique et d'Hygiène du Milieu (LRDEHM). Ils constituent une structure d'appui indispensable pour la surveillance épidémiologique des maladies infectieuses et transmissibles et pour les programmes sanitaires du Ministre de la Santé dans le cadre de l'hygiène et l'environnement.

Actuellement il existe 42 LRDEHM, le laboratoire de Fès fait partie des 11 laboratoires régionaux qui ont vu le jour à partir des années 80. Il est implanté à l'hôpital EL GHASSANI et est individualisé des laboratoires d'analyses cliniques et de transfusion.

Le LRDEHM de Fès a été accrédité NM ISO/CEI 17025-2005. Il a été ainsi certifié aux normes internationales de recherche, diagnostic et analyse. Relevant de la direction régionale de la santé de Fès-Boulemane, le laboratoire a montré durant son processus d'accréditation qu'il est capable de fournir et produire des analyses fiables et de haute qualité

Description du lieu de stage

Le stage a été effectué au LRDEHM de Fès situé à l'hôpital EL GHASSANI relevant de la Direction Régionale de la santé au niveau de l'unité d'hygiène qui comporte :

- Une salle pour la préparation des milieux de culture,
- Une salle pour les analyses microbiologiques de l'eau et des aliments,
- Une salle pour l'incubation et la lecture des résultats,
- Une salle pour la décontamination et le lavage de la verrerie.

Introduction générale

«L'eau, c'est la vie» ; cette affirmation prend un sens tout particulier à l'hôpital où ce fluide est un élément essentiel. Pour chaque malade, l'hôpital consomme chaque jour environ un mètre cube d'eau, soit autant que quatre individus dans la vie communautaire courante; En plus, les patients sont fragiles et la flore microbienne dont l'eau peut être le vecteur représente pour eux un risque potentiel (**Coterehos, 1995**). La distribution d'eau de bonne qualité sera donc nécessaire en permanence en milieu hospitalier.

L'eau potable se doit de satisfaire l'ensemble de des exigences sanitaires. Depuis la source naturelle en passant par l'usine de potabilisation et le réseau de distribution jusqu'au robinet de l'hôpital.

Cependant, la dégradation de la qualité microbiologique de l'eau dans le réseau intérieur de distribution des établissements de santé est liée à la prolifération des micro-organismes présents naturellement dans l'eau et à la contamination exogène. Or, cette eau est utilisée pour divers usages, alimentaires, sanitaires, médicaux techniques, qui nécessitent, outre le maintien de la potabilité, une maîtrise permanente de la contamination par des micro-organismes pathogènes opportunistes" dans les secteurs à risques (**Squinazi, 2000**).

Pseudomonas aeruginosa constitue une des germes opportunistes présents naturellement dans l'eau ou introduits de façon rétrograde à partir de l'environnement hospitalier qui persiste et prolifère dans les réseaux d'eau au sein de communautés multicellulaires appelés biofilms. Sa présence ne cause habituellement pas de maladie, mais peut devenir pathogène lorsque les mécanismes de défense de l'hôte sont altérés (rupture de la barrière cutanéomuqueuse ou altération du système immunitaire) (**Phillipe, 2006**).

Par conséquent, une réglementation stricte (NM 03.7.001) s'applique aux eaux potables. Les normes de qualité concernent tout un ensemble de paramètres chimiques, physiques et microbiologiques.

Parmi les paramètres contrôlés dans l'eau de robinet, les limites de qualité, impératives, concernant les paramètres pouvant avoir une répercussion sur la santé et les références de qualité, sur des paramètres « indicateurs » qui reflètent plus particulièrement le bon fonctionnement des installations de production d'eau potable ;

Néanmoins, la réglementation actuelle impose seulement la recherche de bactéries d'origine fécale. La recherche de pathogènes opportunistes, type mycobactéries atypiques, *Pseudomonas sp.* ... n'est pas mentionnée. De ce fait, le risque microbiologique peut être sous-estimé, voir méconnu (**Office International de l'Eau, 1998**).

C'est dans ce cadre que s'inscrit la présente étude qui a pour objectifs de décrire les risques infectieux liés aux eaux hospitalières et d'évaluer la qualité bactériologique de l'eau distribuée à l'hôpital par le dénombrement et/ou la confirmation de la Flore Mésophile Aérobie Totale, des germes témoins de la contamination fécale et de *Pseudomona aeruginosa*.

REVUE
BIBLIOGRAPHIQUE

I. L'eau à l'hôpital

1. Disponibilité de l'eau à l'hôpital

1.1. Potabilité de l'eau

L'eau doit être disponible en permanence en quantité et en qualité. Sa potabilité, fortement influencée par son origine, doit pouvoir être garantie. Deux situations sont possibles:

- L'eau provient d'un réseau de distribution et sa potabilité est régulièrement contrôlée. Il n'est pas nécessaire dans ce cas que l'hôpital procède à ses propres contrôles (pour éviter des dépenses inutiles) mais les résultats des analyses régulièrement pratiquées par l'organisme distributeur doivent être communiqués.
- L'eau provient d'un forage propre à l'hôpital ou d'un réseau de distribution qui ne peut pas garantir sa potabilité. Dans ce cas, l'eau doit être systématiquement traitée par le chlore. L'efficacité de ce traitement doit être régulièrement contrôlée par un dosage du chlore (**Ragon, 2004**) et des contrôles bactériologiques.

1.2. Eaux destinées à un usage alimentaire

L'eau à usage alimentaire ou eau potable, que la réglementation française et européenne appelle « eau destinée à la consommation humaine » est en général l'eau délivrée à l'établissement par le réseau d'adduction publique. Dans l'établissement, elle est mise à la disposition de tous, aux divers robinets d'eau froide ($\leq 25^{\circ}\text{C}$) alimentés par le réseau de canalisations intérieures de l'établissement (**Ragon, 2004**).

Elle peut être délivrée par une fontaine qui permet de soutirer de l'eau à la température du réseau ou de l'eau à une température plus basse (fontaine réfrigérante) ou conditionnés et dans ce cas en parle des eaux embouteillées du commerce (**Ragon, 2004**).

1.2.1. Eau de distribution publique ou eau potable

Définition : L'eau potable est une eau destinée à l'alimentation humaine, agréable à consommer et qui n'est pas susceptible de porter atteinte à la santé (**Office International de l'Eau, 1998**).

Obtention : L'eau potable provient soit du réseau de distribution publique, soit de captages spécifiques à l'établissement de santé, agréés par décision préfectorale (**Office International de l'Eau, 1998**).

Usages : L'eau de distribution publique ou eau potable est l'eau la plus utilisée dans les établissements de santé. Elle sert pour :

- La boisson et la préparation de glace alimentaire,
- La préparation et la cuisson des denrées alimentaires,
- Le nettoyage des locaux et du linge en blanchisserie,
- Le nettoyage des instruments et du matériel médical,
- Le lavage des mains,
- L'hygiène corporelle des patients,
- Le remplissage des piscines de rééducation fonctionnelle ...

En outre, l'eau potable peut servir de matière première pour l'obtention des autres eaux utilisées en milieu hospitalier, telles que :

- L'eau adoucie utilisée dans les installations de chauffage,
- L'eau purifiée utilisée dans les laboratoires,
- L'eau « bactériologiquement maîtrisée » produite au niveau des blocs opératoires et destinée aux lavages des mains du personnel médical (**Office International de l'Eau, 1998**).

1.2.2. Eau des fontaines réfrigérantes

Définition : L'eau des fontaines réfrigérantes est une eau potable dont la température a été abaissée (< 12°C) par un système de réfrigération, ce qui permet à cette eau d'être désaltérante, sans goût de chlore et économique (par rapport aux eaux conditionnées) (**Office International de l'Eau, 1998**).

Usages : L'eau des fontaines réfrigérantes est destinée à la boisson (consommation du personnel et des malades) (**Office International de l'Eau, 1998**).

1.2.3. Eau conditionnée

Définition : Parmi les eaux conditionnées, on distingue :

- **les eaux minérales naturelles préemballées :** d'origine souterraine, caractérisée par leur qualité microbiologique, la constance de leur composition physico-chimique et sont dotée de propriétés thérapeutiques ;
- **les eaux de source :** d'origine souterraine, naturellement potables,
- **les eaux de table :** ou eaux rendues potables par traitement et préemballée (**Office International de l'Eau, 1998**).

Obtention : Les eaux conditionnées proviennent des industries agroalimentaires (embouteilleurs d'eaux) (**Office International de l'Eau, 1998**).

Usages : Les eaux conditionnées ont un usage alimentaire, en particulier pour les patients à risque (enfants, personnes âgées, immunodéprimés, ...). Pour pouvoir être utilisées pour la préparation des biberons, elles doivent avoir une teneur en nitrates inférieure à 15 mg/L et une teneur en nitrites inférieure à 0,05 mg/L (**Office International de l'Eau, 1998**).

2. Consommation d'eau à l'hôpital

La quantité d'eau utilisée à l'hôpital est assez importante, de l'ordre de sept cent cinquante litres, en moyenne, par lit et par jour avec des variations de cent trente à mille trois cent litres, selon la taille de l'établissement. On évalue à 40% l'utilisation d'eau par le secteur d'hospitalisation et les techniques médicales et à 60% par les services généraux, tels que la blanchisserie et la cuisine (**Squinazi et al., 1998**).

De ces usages diversifiés, sa qualité constitue un élément primordial, que ce soit pour l'eau apportée aux services cliniques ou pour les différentes qualités d'eau en secteur pharmaceutique : eau de lavage des mains du personnel soignant, eau pour la toilette ou les soins des patients et eau pour la désinfection du matériel médicochirurgical (**Bordet, 2013**).

Ceci justifie de définir des objectifs de qualité adaptés à ces différents usages, la potabilité étant un critère minimal demandé (**Squinazi et al. 1998**).

Les risques sanitaires liés à l'utilisation d'eau à l'hôpital sont d'abord des risques microbiologiques (bactérie, parasite..), plus rarement des risques chimiques.

Les microorganismes présents dans l'eau ou colonisant les installations techniques peuvent être directement responsables d'effets pathologiques à court terme et/ou participer à la contamination intra-hospitalière et à l'émergence d'infections nosocomiales (Squinazi et al. 1998). En effet des patients particulièrement contagieux et des patients plus fragiles peuvent se côtoyer assez souvent (**Bordet, 2013**). Il s'avère ainsi indispensable d'évaluer les risques liés à chacune des utilisations de l'eau et de maîtriser, de manière adaptée et cohérente, sa qualité en fonction des ses différents usages (**Squinazi et al. 1998**).

3. Risques infectieux liés aux eaux hospitalières

Les risques majeurs liés à la consommation de l'eau sont d'ordre infectieux. Ils sont provoqués, principalement au niveau digestif, par la présence de bactéries, de virus et/ou de parasites véhiculés par les canalisations de distribution. Ces micro-organismes peuvent déclencher une infection (micro-organismes pathogènes ou opportunistes) ou coloniser le malade (**Ragon, 2004**).

Les infections digestives les plus fréquentes sont les gastro-entérites et les diarrhées. Les bactéries en cause peuvent être : Entérocoques, *E. coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*

enterolytica, *Listeria* ou des bactéries plus spécifiques de l'environnement hospitalier comme *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa* ou *Clostridium difficile* (**Ragon, 2004**).

Les parasites les plus fréquemment impliqués sont les cryptosporidies, *Giardia*, les microsporidies et les amibes intestinales (**Ragon, 2004**).

Ces micro-organismes peuvent se retrouver soit dans le réseau général de distribution d'eau potable, soit dans des réseaux spécifiques de l'établissement (réseau d'eau chaude sanitaire, réseau d'eau pour hémodialyse, ...) (**Office International de l'Eau, 1998**).

Les causes de contamination microbiologique de l'eau sont nombreuses et souvent liées à :

- Une contamination initiale du réseau de distribution publique, ou à une contamination du réseau interne de l'établissement,
- Des problèmes de stagnation des eaux dans des bras morts du réseau (formation d'un biofilm), dans les réservoirs, et même dans certains appareillages,
- Des retours d'eau contaminée dans le réseau, suite à une dépressif (siphonnage) ou à une surpression (refoulement),
- Des travaux réalisés sur le réseau et un non respect des règles d'hygiène,
- La concentration de population de sujets malades (**l'Office International de l'Eau, 1998**).

Une attention particulière doit être accordée à l'eau de distribution publique, car elle sert de matière première pour la préparation des autres eaux. Une eau brute de mauvaise qualité donnera des produits de mauvaise qualité et peut être à l'origine de la dissémination de microorganismes, potentiellement dangereux pour les sujets présents dans les établissements de santé (Immunodéprimés, brûlés, ...). Une telle eau ne doit pas être utilisée pour des actes de soins ou pour un usage alimentaire. (**Office International de l'Eau, 1998**).

II. Les indicateurs de qualité bactériologique des eaux

1. Flore mésophile aérobie totale à 22 et à 37°C

Il s'agit de l'ensemble des microorganismes capables de se multiplier en aérobiose à des températures optimales de croissance comprise entre +20°C et +45°C (**Bonnefoy et al., 2002**).

Cette microflore peut comprendre des microorganismes pathogènes pour l'homme et l'animal mais aussi des microorganismes d'altération variés (**Bonnefoy et al., 2002**).

L'accroissement de la flore mésophile aérobie entre l'eau analysée à l'entrée de l'établissement et l'eau analysée au point d'usage témoigne de la dégradation de la qualité de l'eau du réseau de distribution ou d'une contamination du point d'usage (**Chahid, 2011**).

2. Germes témoins de contamination fécale

Ils sont utilisés pour évaluer la qualité de l'eau destinée à la consommation humaine et doivent répondre à des limites de qualité réglementaires.

2.1. Coliformes totaux

Les coliformes totaux sont définis comme étant des bactéries en forme de bâtonnet, aérobies ou anaérobies facultatives, possédant l'enzyme β -galactosidase permettant l'hydrolyse du lactose à 37°C. Ils constituent un groupe de bactéries que l'on retrouve fréquemment dans l'environnement, par exemple dans le sol ou la végétation, ainsi que dans les intestins des mammifères, dont les êtres humains (**Institut National de Santé Publique du Québec, 2003**).

Les principaux genres inclus dans le groupe sont : *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia* et *Escherichia*, (**Ceaeq, 2000**). Ces bactéries peuvent aussi coloniser le biofilm présent dans tout système de distribution d'eau potable à l'exception d'*Escherichia coli* (*E. coli*).

La présence des coliformes totaux dans l'eau distribuée indique une dégradation de la qualité bactérienne de l'eau.

La presque totalité des espèces sont non pathogènes et ne représentent pas de risque direct pour la santé, à l'exception de certaines souches d'*E. coli* ainsi que de rares bactéries pathogènes opportunistes (**Institut National de Santé Publique du Québec, 2003**).

2.2. Coliformes fécaux

Les coliformes fécaux, ou coliformes thermotolérants, sont un sous-groupe des coliformes totaux capables de fermenter le lactose à une température de 44°C. L'espèce la plus fréquemment associée à ce groupe bactérien est l'*E. coli* et, dans une moindre mesure, certaines espèces des genres *Citrobacter*, *Enterobacter* et *Klebsiella*. La bactérie *E. coli* représente toutefois 80 à 90 % des coliformes thermo tolérants détectés (**Institut national de santé publique du Québec, 2003**).

L'intérêt de la détection des coliformes fécaux à titre d'organismes indicateurs, réside dans le fait que leur survie dans l'environnement est généralement équivalente à celle des bactéries pathogènes et que leur densité est généralement proportionnelle au degré de pollution produite par les matières fécales (**Ceaeq, 2000**).

2.3. Entérocoques intestinaux (Streptocoques fécaux)

Les entérocoques sont des bactéries sphériques, en paire ou en chaîne, à Gram positif, catalase négative et anaérobies facultatives. Ils ne forment pas d'endospores et certaines espèces font preuve de mobilité. Le genre *Enterococcus*, correspondant, aux streptocoques du groupe sérologique D de la classification de Lancefield est celui recherché dans les eaux potables. Le genre *Enterococcus* comprend une vingtaine d'espèces qui se retrouvent dans différents habitats et chez différents hôtes. On les retrouve souvent dans le tractus gastrointestinal des humains et de plusieurs animaux; *Enterococcus faecalis* et *E. faecium* sont les deux espèces le plus souvent identifiées chez l'humain (**Institut National de Santé Publique du Québec, 2002**).

Elles sont présentes dans les intestins d'environ 75 % des humains, à des concentrations variant de 10^5 à 10^8 bactéries/g (**Institut national de santé publique du Québec, 2002**).

La persistance des entérocoques dans divers types d'eau peut être supérieure à celle des autres organismes indicateurs, notamment à cause de leur résistance notoire aux agents désinfectants ce qui fait d'eux des indicateurs privilégiés pour évaluer l'efficacité du traitement de l'eau. De plus, leur grande résistance à la dessiccation fait des entérocoques des indicateurs pour le contrôle lors des réparations du réseau de distribution nécessitant un assèchement (**Institut National de Santé Publique du Québec, 2002**).

Par ailleurs, puisqu'il n'y a généralement pas de croissance des entérocoques dans un réseau de distribution, leur détection témoigne généralement d'une pollution fécale récente (**Institut National de Santé Publique du Québec, 2002**).

3. Spores de microorganismes anaérobies sulfito-réducteurs

Les Spores de microorganismes anaérobies sulfito-réducteurs (ASR) sont répandues dans l'environnement. Elles sont présentes dans les matières fécales humaines et animales, ainsi dans les eaux usées et le sol (**Zerhouni J, 2015**).

Ces germes se caractérisent par leur longue survie dans l'eau car elles sont plus résistantes que les formes végétatives à l'action des facteurs chimiques et physiques, ce qui n'est pas le cas pour les *Escherichia coli* et les autres organismes coliformes. Elles peuvent ainsi fournir des indications sur une pollution fécale éloignée ou intermittente (**Bentabet, 2014**).

Elles Peuvent même être résistantes à la chloration dans les proportions habituellement utilisées pour le traitement des eaux, et sont donc ainsi utiles pour les besoins des contrôles (**Bentabet, 2014**).

4. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa (*P. aeruginosa*) est une bactérie gram négative du genre *Pseudomonas* de la famille des Pseudomonadaceae qui comporte de très nombreuses espèces répandues dans l'environnement (**Leclerc, 2002**).

Les bacilles sont fins, droits et très mobiles grâce à un flagelle polaire : ciliature monotriche, dépourvus de spores et de capsules. Ils apparaissent la plupart du temps isolés ou en diplobacilles (**Mans et Canouet, 2008**).

P. aeruginosa produit deux pigments qui confèrent aux cultures une teinte caractéristique à l'origine du qualificatif de pyocyanique (bacille du « pus bleu ») : la pyocyanine, bleu vert, et la pyoverdine, jaune vert et fluorescent (**Leclerc, 2002**).

Elle se trouve dans les eaux chaudes sanitaires, dans les tours de refroidissement, dans les piscines, les eaux des éviers, des siphons et aussi dans les eaux embouteillées, ...C'est un germe aquicole qui se multiplie dans l'eau quel que soit son contenu en matières organiques (**Leclerc, 2002**).

P. aeruginosa a toutes les caractéristiques d'un germe opportuniste : il est peu virulent pour les sujets en bonne santé mais très pathogène et par conséquent très dangereux pour les sujets prédisposés (**Mans et Canouet, 2008**).

Ils sont surtout impliqués dans les infections pulmonaires nosocomiales, en particulier dans les services de réanimation où il arrive en première position, dans les infections de la peau et des tissus mous et les surinfections des plaies opératoires (**Decoster**).

**MATARIEL ET
METHODES**

I. Lieu et période d'étude

Notre travail a été une étude prospective de la qualité hygiénique des eaux au niveau des hôpitaux de Fès, qui a été réalisé pendant une durée d'un mois et demi (Du 15 Avril au 30 Mai) au niveau de l'Unité d'Hygiène du Laboratoire Régional de Diagnostic Epidémiologique et d'Hygiène du Milieu (LRDEHM) de Fès.

II. Matériel utilisé

- * Matériel de stérilisation : Bec bunsen et autoclave
- * Alcool à brûler
- * Incubateurs à 37°C, 22°C et 44°C.
- * Matériel de microbiologie : Boîtes de Pétri stérile de grand et de petit diamètre et des pipettes stériles à usage unique.
- * Système de filtration sur membrane (pompe à vide et rampe à filtration).
- * Des membranes de porosité 0,45 μ m et 0,22 μ m.
- * Des milieux de cultures appropriés.

III. Méthodes de contrôle de la qualité bactériologique de l'eau potable

1. Echantillonnage

L'échantillonnage est l'élément primordial de l'analyse bactériologique des eaux. L'échantillon doit être assez représentative de l'eau à analyser pour extrapoler les résultats obtenus au laboratoire à l'ensemble du lot.

Le prélèvement des échantillons a été effectué par des techniciens d'hygiène du milieu.

2. Prélèvement des échantillons d'eau

15 échantillons d'eau ont été prélevés de manière aseptique dans des flacons stériles de capacité de 500 ml.

L'agent responsable du prélèvement devra recueillir un maximum de renseignements en relation avec la qualité bactériologique de l'eau : origine de l'eau, nature du captage, nature du traitement éventuel (teneur en chlore), température lors du prélèvement.

L'acheminement des échantillons depuis les différents points de la collecte jusqu'au laboratoire a été réalisé d'une manière conforme, dans des glacières maintenues entre 4 et 8 °C.

3. Techniques d'analyses utilisées pour le contrôle bactériologique de l'eau

L'analyse des germes totaux, des coliformes totaux et fécaux, des entérocoques intestinaux et des ASR a été effectuée selon la norme marocaine (NM 03.7.001).

3.1. Dénombrement de la flore mésophile aérobie totale à 22°C et à 37°C

Le dénombrement de ces microorganismes a été effectué par incorporation sur gélose qui consiste à dénombrer les microorganismes viables présents dans une portion d'échantillon d'eau.

Après agitation vigoureuse de l'échantillon d'eau, 1 ml de l'échantillon a été prélevé à l'aide d'une pipette stérile et a été déposé dans une boîte de Pétrie stérile puis la gélose nutritive (Gélose à l'extrait de levure) maintenue liquéfiée à environ 45°C a été coulé. Les boîtes ont été ensuite mélangées par rotation et ont été laissées solidifier dans une zone stérile.

L'incubation des boîtes a été faite à 22°C pendant 72 h et à 37°C pendant 48 h (NM 03.7.001) (voir tableau.1).

Tableau.1. Spécifications des eaux d'alimentation humaine : Paramètres à effet sanitaire (NM 03.7.001)

Paramètres	Valeur Maximale Admissible(VMA)	Remarque
Coliformes	0/100 ml	Pas de coliformes dans 95% des échantillons prélevés sur une période de 12 mois
Micro-organismes revivifiables à 22 °C et 37 °C	20/1 ml à 37°C 100/1 ml à 22°C	Variation dans un rapport de 10 par rapport à la valeur habituelle
Escherichia coli	0/100 ml	Non détectables dans un échantillon de 100 ml
Entérocoques intestinaux	0/100 ml	Non détectables dans un échantillon de 100 ml

3.2. Dénombrement des germes témoins de contamination fécale

3.2.1 Coliformes Totaux et Fécaux (*E. coli*)

Les coliformes sont des microorganismes indicateurs de contamination fécale dont le dénombrement permet de déceler le niveau de pollution d'origine organique dans les canalisations d'eau potable.

Après filtration de l'échantillon d'eau, la membrane a été ensuite incubée pendant 24 heures à 37°C sur un milieu gélose lactosée au TTC et Tergitol (NM 03.7.001).

Après l'incubation à 37°C, les colonies jaunes orangées (Fig. 1) ont indiqué la fermentation du lactose et ont été soumis à des tests de confirmation :

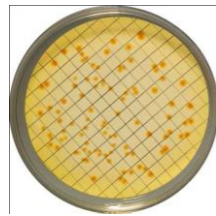


Fig. 1. Développement des coliformes dans un milieu Tergitol au TTC

*Epreuve du cytochrome oxydase

Le test oxydase a été utilisé pour déterminer la présence des enzymes oxydases associées aux Cytochromes de la chaîne respiratoire. Il a été basé sur le principe que certains dérivés phényldiamine sont oxydés en présence de cytochrome C en produisant l'indophénol de couleur bleue.

Ce test a été réalisé en frottant la colonie à tester sur un disque utilisant des disques de papiers filtre imprégnés d'une solution aqueuse à 1 % de di-chlorure de tétraméthyl-pphénilène- diamine. La réaction est dite positive dans le cas de l'apparition d'une couleur bleue violet. au bout de 30 secondes.

Les coliformes totaux ne possèdent pas l'enzyme appelé oxydase et produisent une réaction négative (oxydase-).

*Test de production d'indole

Le milieu urée tryptophane a été ensuite ensemencé puis incubé à 37°C pendant 24 heures, l'addition du réactif de Kovacs (diméthyl-amino-4-benzaldéhyde), pour mettre en évidence la présence de l'indole, produit de l'activité de la tryptophanase, en formant un composé coloré en rouge à la surface du bouillon (Fig.2).

E. coli ont des colonies oxydase **négative** et indole **positive**.

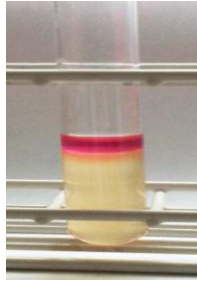


Fig.2. Test indole positif reflétant la présence d'*E. coli* (formation d'un anneau rouge)

3.2.2. Entérocoques intestinaux

Après avoir réalisé le protocole de filtration de l'échantillon, la membrane a été déposée sur le milieu Gélosée de Slanetz et Bartley contenant de l'azide de sodium (pour supprimer la croissance des bactéries Gram négative et le TTC).

Après incubation du milieu à 37°C pendant 24 heures, les colonies typiques présentant une coloration rouge brique (Fig.3) ont été alors comptées et ont subis un test de confirmation qui a été effectué par transfert de la membrane sur une gélose à la bile, à l'esculine et à l'azide (BEA) préchauffée à 44°C. Les entérocoques intestinaux hydrolysent l'esculine sur ce milieu en 2 h (NM 03.7.001).

Le produit de la réaction, la 6,7 dihydroxycoumarine, se combine aux ions ferriques pour donner un composé noir qui diffuse dans le milieu.

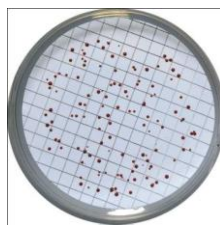


Fig. 3. Développement des entérocoques intestinaux dans le milieu Slanetz (colonies rouges brique)

3.2.3. Spores de micro-organismes anaérobies sulfito-réducteurs

La recherche des ASR a été faite par filtration sur membrane de 0,22 μ m de diamètre des pores de 100 ml de l'échantillon à analysé puis incubation à 37 °C pendant 24 à 48h du milieu SPS en anaérobiose (ISO 6461-2, 1993).

Les colonies noires ont été énumérées.

3.2.4. *Pseudomonas aeruginosa*

La méthode utilisée a été le dénombrement par filtration sur membrane. Après filtration de 100 ml de l'échantillon sur une membrane de 0,45 μ m de diamètre des pores, cette dernière a été prélevée à l'aide d'une pince stérile et a été incubée pendant 48 heures à 42°C sur un milieu sélectif solide, la gélose au cétrimide. La température élevée et la présence d'inhibiteurs ont favorisé la croissance sélective de *Pseudomonas aeruginosa* qui est caractérisée par des colonies présentant une pigmentation caractéristique bleu ou bleu vert (Fig.4).

Pour les colonies typiques, une étape de confirmation a été nécessaire :

- Épreuve de la cytochrome oxydase : *Pseudomonas aeruginosa* est Oxydase+ ;
- Production de Pyocyanine (pigment bleu vert) sur milieu King A.

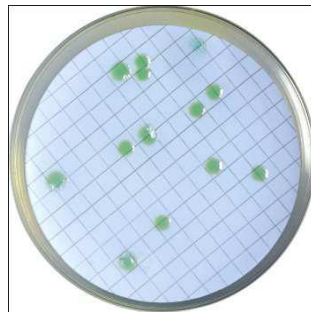


Fig. 4. Développement de *Pseudomonas aeruginosa* sur le milieu cétrimide

RESULTATS ET DISCUSSIONS

I. Qualité microbiologique des échantillons d'eau analysés

L'étude a été portée sur 15 échantillons d'eau potable (eaux de réseau traité (RT)) provenant des hôpitaux de la ville de Fès sur une période d'un mois et demi.

1. Evaluation de la non-conformité global des échantillons d'eau analysés

Tous les 15 échantillons d'eau analysés ont été de bonnes qualités bactériologiques Soit un pourcentage de non-conformité de 0% (Tableau 2). Ce résultat est discordant avec celui (57,89%) obtenu par **Chiguer** (2013) lors d'une étude sur 40 échantillons d'eau à l'hôpital Ibn Sina de Rabat.

Conformité	Nombre total	C	NC	%NC
Eaux	15	15	0	0

Tableau 2 : Non-conformité global des échantillons d'eau analysés

Conforme (C), Non conforme (NC), Pourcentage non conformité (%NC)

2. Etude de la non-conformité selon les germes en cause

Le tableau 3 représente les résultats des germes dénombrés et/ou confirmés dans les échantillons d'eau analysés.

Tableau 3: Résultats des analyses bactériologiques des échantillons d'eaux analysées

Type d'eau	GT 22°C	GT 37°C	CT	CF	EI	ASR	PA
RT	0	4	0	0	0	0	0
RT	0	0	0	0	0	0	0
RT	0	0	0	0	0	0	0
RT	0	0	0	0	0	0	0
RT	0	0	0	0	0	0	0
RT	0	0	0	0	0	0	0
RT	0	0	0	0	0	0	0
RT	0	0	0	0	0	0	0
RT	0	0	0	0	0	0	0
RT	0	0	0	0	0	0	0
RT	0	0	0	0	0	0	0
RT	0	0	0	0	0	0	0
RT	0	0	0	0	0	0	0
RT	0	0	0	0	0	0	0
RT	0	0	0	0	0	0	0

Réseau traité (RT), Germes totaux (GT), Coliformes totaux (CT), Coliformes fécaux (CF), Entérocoques intestinaux (EI), Anaérobies sulfito-réducteurs (ASR), Pseudomonas aeruginosa (PA)

D'après les résultats rapportés sur le tableau 3, le nombre des germes totaux (GT) détecté dans les échantillons d'eau analysés a été de 0 UFC par 100 ml d'eau pour les germes totaux à 22°C et se situe entre 0 UFC et 4UFC par 100 ml pour les GT à 37°C.

Ces résultats sont contradictoires avec ceux obtenus par Chiguer, (2013) qui a obtenu une valeur minimale des GT de 0 UFC/100 ml et une valeur maximale de 10⁶ UFC/ 100 ml.

Alors que les coliformes totaux (CT) ont été absents dans tous les échantillons analysés.

Ces résultats sont semblables avec ceux obtenus par **Aoun et Nohra** (2010) lors d'une étude sur 40 échantillons d'eau à l'hôpital Saint Charles Par contre, ils sont disconcordent avec ceux enregistrés par **Chiguer, (2013)**, à savoir 100% des échantillons ont été contaminés par les coliformes totaux.

Aussi, les coliformes fécaux (CF) ont été absents dans notre étude.

Ce résultat est similaire avec celui obtenu par Aoun et Nohra (2010) et par Chiguer, (2013) qui ont rapportés qu'aucun des échantillons d'eau n'a été contaminé par les coliformes fécaux.

En ce qui concerne les Entérocoques intestinaux, le nombre obtenu a été de l'ordre de 0 UFC/100 ml.

Ce résultat est semblable avec celui obtenu par Aoun et Nohra (2010). Alors que, l'incidence des EI a été de 14,28% dans les échantillons analysés dans l'étude menée par Chiguer ,(2013).

D'après les résultats obtenus, aucune spore des ASR n'a été détectée lors de notre étude ce qui implique une non contamination de ces eaux par ces germes.

Aussi, aucune *P. aeruginosa* n'a été décelé.

Ce résultat est similaire à celui obtenu par Aoun et Nohra (2010) et par Chiguer, (2013), ce qui indique une bonne qualité hygiénique des eaux hospitaliers.

Conclusion générale

Notre travail a été une étude prospective, qui a porté sur le contrôle de la qualité hygiénique des eaux au niveau des hôpitaux de Fès, au niveau de l'unité d'hygiène du Laboratoire Régional de Diagnostic Epidémiologique et d'Hygiène du Milieu (LRDEHM) de Fès.

Les résultats obtenus ont montré que sur 15 échantillons d'eau analysés et selon les limites de conformité de la norme marocaine 03.7.001, les échantillons ont montré une conformité au niveau des coliformes, des entérocoques intestinaux, des ASR et des germes revivifiables. La recherche de *Pseudomonas aeruginosa* a révélé son absence.

Ces résultats confirment la bonne qualité hygiénique de l'eau distribuée dans les établissements de santé. Ceci n'empêche pas de faire une vérification périodique pour s'assurer de la qualité de l'eau afin d'éviter la survenue d'infections nosocomiales liées à la contamination de l'eau distribuée.

Références bibliographiques

Anne Decoster. Cour de bactériologie médicale : Pseudomonas

Bentabet Fatima Zohra, 2014. Analyses bactériologique des eaux et contrôle de qualité du milieu de travail : Projet de fin d'étude : Licence sciences et technique Biotechnologies, hygiène et sécurité alimentaires.

CEAEQ, 2000. Recherche et dénombrement des coliformes totaux; méthode par filtration sur membrane. Centre d'expertise en analyse environnementale, Gouvernement du Québec, 25 p.

Cécile Phillipe, 2006. Les micro-organismes de l'eau impliqués dans les infections nosocomiales

Chahid Ksabi Rababe, 2011. Mémoire de fin d'étude: Proposition d'une stratégie de surveillance de la qualité de l'eau dans un établissement de santé

Chiguer Mahfoud, 2013. La qualité microbiologique des eaux a l'hôpital Ibn Sina de Rabat. Thèse pour l'obtention du doctorat en pharmacie. Université Mohammed V -Souissi Faculté de Médecine et de pharmacie

Comité technique régional de l'environnement hospitalier, Direction Régionale des Affaires Sanitaires et Sociales Rhone Alpes, Coterehos, 1995 : L'eau dans les établissements de santé

F. Squinazi., PH. Brunet., C. Gulian., J.C. Labadie., A. Spinasse, 1998. L'eau à l'hôpital. Hygiène hospitalière. p : 351.

F. Bordet., G.P. Husson, 2013. L'eau à l'hôpital. ASSES.

Françoise Guillet., Caroline Bonnefoy., Guy Leyral., Évelyne Verne-Bourdai. Microbiologie et qualité dans les industries agroalimentaires. Chapitre 5 : Populations contaminantes altérante la qualité sanitaire et marchande. p : 101.

Hall-Stoodley., L. J. W. Costerton., P. Stoodley, 2004. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. Nat. Rev. Microbiol. 2:95-108

Henri Leclerc, 2002. Bactériologie de Pseudomonas aeruginosa. Presse therm climat 2002; 139: 9-13

Institut national de santé publique du Québec, 2003. Groupe scientifique sur l'eau. Fiche coliforme totaux.

Institut national de santé publique du Québec, 2003. Groupe scientifique sur l'eau. Fiche coliforme fécaux

Institut national de santé publique du Québec, 2002. Groupe scientifique sur l'eau. Fiche Entérocoques et streptocoques fécaux.

J.C. Denys., D. Deniau, 2011. Prévention des risques liés à l'eau dans les établissements de santé de la Réunion. Hygiènes - 2011 - Volume XIX - n° 6. p : 385

Office international de l'eau, 1998. Qualité de l'eau dans les établissements de santé.

O'Toole, G. A., L. A. Pratt., P. I. Watnick., D. K. Newman., V. B. Weaver., et R. Kolter, 1999. Genetic approaches to study of biofilms. *Methods Enzymol.* 310:91-109 20

RAGON Alain, 2004. L'eau et la santé dans les établissements de soins.

S. Mans., S. Canouet, 2008. *Pseudomonas aeruginosa* : une histoire d'eau. Centre Hospitalier du Val d'Ariège

Squinazi F, 2000. Eau du réseau dans les établissements de santé : maîtrise des risques infectieux hydriques, 2000. *Médecine et maladies infectieuses*, 2000, vol. 30, no7, pp. 431-440 (48 réf.)

Zerhouni J., Rhazi Filali., Aboukacem, 2015. Qualité et facteurs de risque de pollution des eaux souterraines périurbaines de la ville de Sebaa Ayouné (Meknès, Maroc). *Larhyss Journal*, ISSN 1112-3680, n°22, June 2015, pp. 91-107.

Annexe

A. Les milieux de culture utilisés

Gélose Lactosée au Térgitol 7 et au TTC

- Peptone10,0 g
- Extrait de viande 5,0 g
- Extrait de levure6,0 g
- Lactose20,0 g
- Térgitol 710 mg
- TTC (Triphenyl Tetrazolium Chloride : nom anglais du Chlorure de Triphényl
Tétrazolium)25 mg
- Bleu de bromothymol..... 50 mg
- Agar 13,0 g
- pH = 7,2

Gélose de Slanetz et Bartley

- Agar-agar.....10 g
- Peptone.....20 g
- Azide de sodium.....0,4 g
- Glucose.....2 g
- TTC (chlorure de 2-3-5 triphényl-tétrazolium).....0,1 g
- pH = 7,2

Bile esculine azide

- Peptone.....17,0 g
- Peptone pepsique de viande.....3,0 g
- Extrait de levure.....5,0 g
- Esculine1,0 g
- Citrate de sodium.....1,0 g
- Citrate de fer ammoniacal.....0,5 g
- Bile de bœuf déshydratée.....10,0 g
- Azide de sodium0,25 g
- Chlorure de sodium.....5,0 g
- Agar.....13,0 g

Gélose à l'extrait de levure

- Extrait de viande1,0 g
- Extrait de levure2,5 g
- Peptone.....5,0 g
- Chlorure de sodium.....5,0 g
- Agar15,0 g
- pH = 0,7

Gélose au cétrimide

- Peptone de gélatine.....16,0 g

- Peptone de caséine.....10,0 g
- Bromure de tétradonium cétrimide).....0,2 g
- Acida nalidixique.....15,0 mg
- Sulfate de potassium.....10,0 g
- Chlorure de magnésium.....1,4 g
- Agar.....10,0 g
- pH = 7,1

King A

- Peptone dite 'A'20,0 g
- Glycérol.....10,0 g
- Sulfate de potassium.....10,0 g
- chlorure de magnésium.....1,4 g
- Agar purifié.....12,0 g
- pH = 7,2

Sulfadiazine-polymyxine- sulfite

- Caséine.....15g
- Extrait de levure.....10g
- Sulphite de sodium.....0,5g
- Sulphadiazine.....0,12g
- Sulphate.....0,01g
- Citrate ferrique.....0,50g
- Agar.....13,90g