



**UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH**  
**FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE FÈS**  
**DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE**



**Projet de Fin d'Études**

Licence Sciences & Techniques  
« Bioprocédés, Hygiène & sécurité alimentaires »

**Qualité De L'eau de soins standards au sein du**  
**Centre Hospitalier Universitaire Hassan II de Fès**

**Présenté par** : Mlle MESBAH RAJAA

**Encadré par** : Pr. LOTFI AARAB  
Pr. OUMOKHTAR BOUCHRA

**Soutenu le** : 11/06/2019

**Devant le jury composé de** :

Pr. LOTFI AARAB  
Pr. SAMIR ANANOU

Stage effectué au :  
Laboratoire de microbiologie et biologie moléculaire de la  
Faculté de médecine et de Pharmacie de Fès

Année universitaire 2018-2019

# Remerciement

A l'issue de ce fructueux stage, je tiens à exprimer ma gratitude à mon encadrante **Pr OUMKHTAR BOUCHRA**, Professeur à la faculté de médecine et de pharmacie de Fès, pour sa collaboration, ses pertinentes directives et conseils, et son expérience qui m'a permis d'évoluer rapidement dans l'apprentissage du domaine du contrôle de la qualité et de l'analyse microbiologique.

Mes sincères remerciements s'adressent à **Pr LOTFI AARAB**, mon encadrant pédagogique, Professeur à la Faculté des Sciences et Technique de Fès, pour son encadrement exemplaire, pour ses précieux conseils, ses remarques et directives pertinentes et pour l'intérêt qu'il a porté à mon projet de fin d'études.

J'exprime ma gratitude à nos enseignants et tous les membres du corps professoral de la licence **BioProcédés, Hygiène & sécurité alimentaires** de la Faculté des Sciences et Technique de Fès.

Je suis très sensible à l'honneur que nous a fait **Pr SAMIR ANANOU**, en acceptant de participer à l'évaluation de mon travail. Je Vous exprime toute ma reconnaissance pour l'intérêt porté à cette soutenance.

Je tiens également à remercier toutes les personnes qui ont contribué au bon déroulement de mon stage.

# Dédicaces

## **A Mes Très Chers Parents**

Tous les mots du monde ne sauraient exprimer l'immense amour que je vous porte, ni la profonde gratitude dont je vous témoigne pour tous les efforts et les sacrifices que vous n'avez jamais cessé de consentir pour mon instruction et mon bien-être.

C'est à travers vos encouragements et vos critiques que je me suis réalisée.

Je vous rends hommage par ce modeste travail en guise de ma reconnaissance éternelle et de mon amour infini.

Que Dieu tout puissant vous garde et vous procure santé, bonheur et longue vie pour que vous demeuriez le flambeau illuminant le chemin de vos enfants.

## **A mon frère et ma très chère sœur**

Vous m'aviez toujours aidé et ces quelques lignes sont insuffisantes pour exprimer mon profond amour et ma reconnaissance pour les honorables services soutenus.

## **A ma grande famille**

En témoignage de mon respect et de mon amour.

## **A mes amies**

En souvenir des agréables moments partagés.

## **A mes professeurs**

Je vous remercie pour vos efforts, vos conseils et votre aide précieuse.

# Sommaire

Cadre de stage	
Introduction.....	1
Partie I : Revue Bibliographique.....	2
I.EAU A USAGE MÉDICALE .....	3
1-Définition : .....	3
2-typologie de l'eau .....	3
1- les eaux ne subissant aucun traitement dans l'établissement de santé.....	3
1.1-eau à usage alimentaire .....	3
1.2- les eaux pharmaceutiques inscrits à la pharmacopée .....	3
2- les eaux traitées au sein de l'établissement de santé, répondant à des critères définis En fonction des usages alimentaires, sanitaires et de soins : .....	4
2.1- Eau bactériologiquement maîtrisée.....	4
2.2-Eau pour soins standards .....	5
2.3-Eau potable stérilisée.....	5
2.4- L'eau des piscines de rééducation et bain a remous .....	6
3-les eaux techniques produites au sein de l'établissement de santé.....	7
3.1-Eau déminéralisée.....	7
3.2- Eau distillée .....	7
3.3-L'eau osmosée.....	7
3.4-Eau adoucie .....	7
4-Eau chaude sanitaire .....	8
II- les risques infectieux liés à l'eau dans établissement de soins.....	8
Partie II : Matériel et méthode.....	11
1-lieux et période de stage.....	12
2-Échantillonnage.....	12
3-Analyse bactériologique.....	12
3-1. Analyse des eaux traitées.....	13

3-2. Milieu de culture : .....	13
3-3. Protocole de la filtration .....	13
Partie III :Résultat et discussion.....	16
I-Résultat des analyses bactériologiques de l'eau.....	16
1.Eau de soins standards : .....	16
2-Résultat. ....	16
3.Discussion .....	17
Conclusion.....	18
Références .....	19

# Cadre de stage

## ▪ Présentation du lieu de stage :

Mon stage de fin d'étude en licence BioProcédés, Hygiène & sécurité alimentaires a été réalisé au sein de l'un des 8 laboratoires de recherches de la faculté de Médecine et Pharmacie de Fès.

### I) Laboratoire de Microbiologie et Biologie

#### Moléculaire

Le laboratoire de « **Microbiologie et Biologie Moléculaire** » fait partie du Laboratoire de recherche en « **Pathologie Humaine, Biomédecine et Environnement** »

### II) Structure du Laboratoire de Recherche Biologique

Les différentes équipes dont se compose le laboratoire de **Laboratoire Pathologie Humaine,**

#### **Biomédecine et Environnement :**

- Anatomie Pathologique.
- Microorganismes et Facteur oncogènes.
- Physiopathologie et Nutrition.
- Génomique et Santé.
- Maladie de l'appareil digestif.
- Les éléments traces Métalliques.



### III) Équipement du Laboratoire

Le laboratoire est équipé d'un appareillage de pointes qui permet de réaliser :

- L'identification des bactéries par des tests Biochimiques ou par des galeries API.
- L'antibiogramme.
- Extraction d'ADN et PCR.

#### ▪ Parmi les techniques maîtrisées durant la période de stage:

##### • Préparation et stérilisation des milieux de cultures

Pour préparer des milieux de culture de bonne qualité microbiologique, il existe plusieurs conditions qu'il faut respecter :

Tout d'abord dès la réception du milieu de culture il faut bien consigner le milieu avec la date de réception d'une part, et de conserver le milieu en suivant les recommandations données sur l'étiquette d'une autre part.

Après l'ouverture du produit, il faut toujours vérifier la date de péremption et noter la date d'ouverture du produit.

##### • Protocole de préparation des milieux :

Pour préparer un milieu de culture il faut suivre différentes étapes :

##### 1. Dissolution :

Peser la quantité appropriée du milieu, dans un flacon mettre en suspension la masse pesée de milieu déshydraté dans le volume de l'eau distillée nécessaire à la reconstitution, agiter lentement la solution puis, porter le mélange à l'ébullition sous agitation constante jusqu'à dissolution complète.

##### 2. Stérilisation :

Après la dissolution totale du produit, porter ce dernier à l'autoclave à une température de 121°C pendant 20 à 30 min.

##### 3. Refroidissement :

Après autoclavage, il est important de laisser refroidir le milieu c'est pour cela, on pose le flacon dans un bain d'eau thermostaté à température comprise entre 44°C et 47°C.

- Après stérilisation et refroidissement le milieu doit être manipulé dans des conditions aseptiques afin de le protéger contre les contaminations extérieures.
- Avant de couler les milieux, il faut tout d'abord vérifier que toutes les boîtes de pétri sont stériles et en bon état, puis il est important d'identifier le type de gélose sur la plaque des boîtes de pétri.
- Cela étant, on coule les milieux dans les boîtes le plus rapidement possible, et on laisse solidifier les géloses.

#### 4. Contrôle de qualité des milieux de culture :

Avant de conserver les milieux de culture au réfrigérateur à une température de +4°C il faut réaliser le test de stérilité qui consiste à incuber les boîtes dans une étuve à 35°C pendant 18 à 24h, même haut de là, l'absence de culture bactérienne valide le test.

#### Remarque :

Concernant la préparation des géloses en tubes, après répartition du milieu en tubes et autoclavage, incliner les tubes de manière à obtenir une pente oblique et un culot de 3cm pour faciliter l'ensemencement par piqûre dans le culot, comme le cas pour le milieu Kligler.

#### 5. Conservation :

Conserver les milieux préparés dans le réfrigérateur à une température de 4°C. Avec boîtes inversés et toujours le couvercle vers le bas.

#### • **Ensemencement d'un prélèvement :**

L'ensemencement se fait dans des conditions de stérilité rigoureuses, à partir de colonies ou de suspension bactérienne, à l'aide d'une « pipette Pasteur » ou d'une anse, sur différents milieux dont on distingue :

-Des milieux sélectifs: permettent uniquement la culture de certains genres de micro-organismes. Pour cela on ajoute des éléments qui inhibent la croissance des micro-organismes indésirables comme le chlorure de sodium à forte concentration, le thiosulfate de sodium, le cristal violet ou certains antibiotiques, etc. Les éléments

ajoutés sont sélectionnés selon les caractéristiques du micro-organisme recherché.

Parmi ces milieux on peut citer:

- Le **milieu chapman**: 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.
  - Le **milieu Éosine Bleu de Méthylène(EMB)**: milieu d'isolement des bacilles Gram négatif et aussi pour l'isolement des coliformes.
- Des milieux non-sélectifs: permettent la croissance de tous genres de micro-organismes comme le **milieu Trypto-caséine Soja (TSA)**.
- Des milieux d'enrichissement: comme le **milieu Brain Heart Infusion(BHI)**.
- Des milieu pour Antibiogramme: **milieu Mueller-Hinton (MH)**,gélose riche pour la réalisation de l'antibiogramme standard.

les principaux types d'ensemencements que nous réalisons au laboratoire :

- ensemencement d'une culture en tubes.
- isolement par épuisement d'une culture en boites.
- tapis bactérien pour antibiogramme.

### **I- ensemencement d'une culture en tubes**

L'utilisation d'un bouillon permet une pousse rapide et homogène des bactéries. Cependant, il a des désavantages. En effet, s'il y a plusieurs espèces bactériennes dans un prélèvement ou une contamination extérieure, il est impossible de différencier les différentes espèces bactériennes présente puisque les cellules se trouvent en milieu liquide donc mélangées...

La technique d'ensemencement d'un bouillon est cependant très simple :

- Stériliser l'instrument servant à prendre la souche bactérienne d'origine (pipette dans le cas de bouillon, anse dans le cas d'une colonie)
- Prélever la souche à ensemercer
- Stériliser l'ouverture du flacon de bouillon stérile

- Ensemencer le bouillon à l'aide du prélèvement effectué précédemment
- Restériliser l'ouverture du flacon de bouillon
- Stériliser l'instrument

Puis incuber dans les conditions optimales.

## **II-isolement par épuisement d'une culture en boites (technique des quadrants ou par épuisement)**

C'est le type de base des ensemencements. En effet, il permet s'il est bien réalisé, d'obtenir **des colonies isolées**, donc des **cultures pures** d'une espèce bactérienne.

Le principe de ce type d'ensemencement est d'épuiser un dépôt initial en faisant des étalements successifs dans différentes directions (d'où le nom de la technique : épuisement par la méthode des quadrants). Deux techniques sont couramment appliquées : 4 ou 5 étalements successifs.

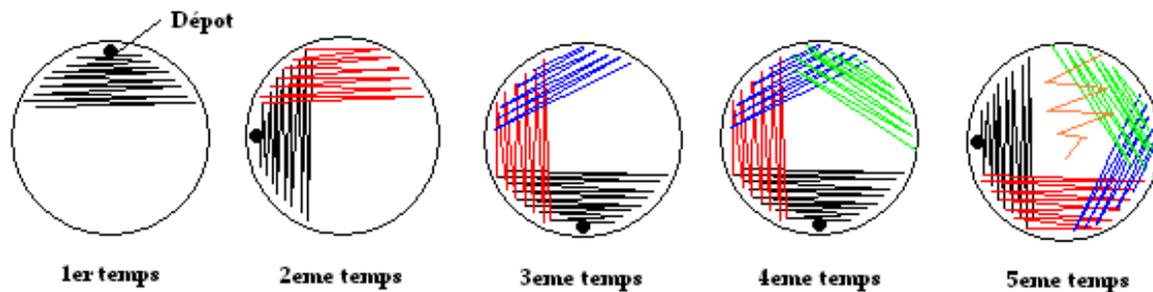


Figure 1 :technique de l'épousage d'une culture sur milieu solide par 4 ou 5 étalements successifs.

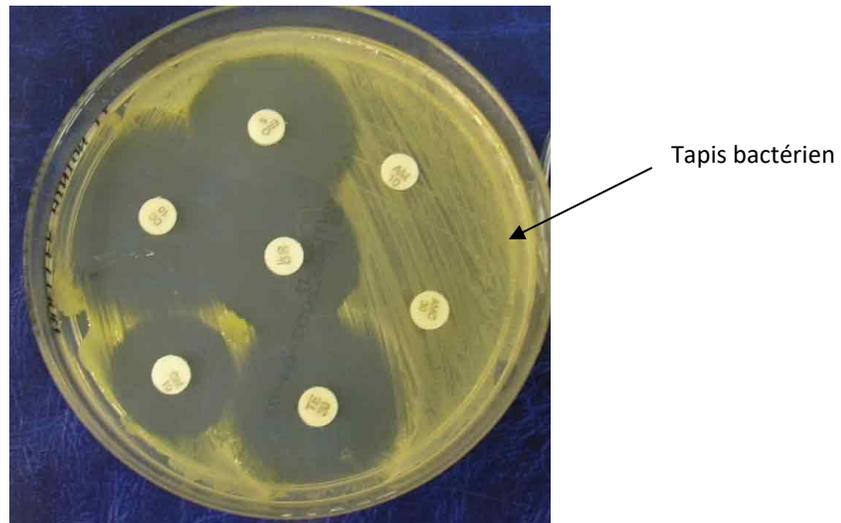
Description de la technique en 5 étalements :

- Dépôt initial de la souche près d'un bord d'une boîte de gélose adaptée à l'espèce désirée
- Étalement de ce dépôt en réalisant des stries serrées sur environ 1/3 de la boîte
- Stérilisation de l'instrument d'étalement
- Étalement d'une partie des stries précédentes, après avoir fait tourner la boîte d'environ 60 °
- Répétition des deux étapes précédentes 2 fois.

Si la technique est correctement réalisée et si le dépôt n'est pas trop important, après incubation, la boîte doit présenter des colonies isolées en son centre

### **III-I 'ensemencement en tapis pour l'antibiogramme**

A l'aide de cette technique, on obtient après incubation un tapis bactérien, c'est-à-dire des colonies isolées mais confluentes. L'ensemencement à partir d'un inoculum se fait à l'aide d'un écouvillon stérile, on réalise des stries serrées en trois étalements sous angle de 60 degrés.



**Figure 2 :résultat d'un antibiogramme après incubation**

#### **Parmi les règles élémentaires concernant l'ensemencement :**

- Travailler en zone stérile.
- Désinfecter la paillasse.
- Le pipetage à la bouche est strictement interdit (risques de contamination bactériologique).
- La pipette Pasteur ne sert qu'une fois seulement.

- **Technique d'identification:**

L'identification constitue la majorité des analyses bactériologiques réalisées au laboratoire. Néanmoins, cette démarche comporte 3 types :

- Identification selon la morphologie: taille, contour, l'opacité, aspect,
- Identification par coloration de gram
- Identification par les tests biochimiques et la confirmation par l'api 20<sup>E</sup> (dans le cas des **Entérobactéries**).

- **Identification par coloration de Gram :**

C'est une coloration qui permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne pour distinguer et classer les bactéries à gram Positif, qui gardent la couleur violette des bactéries à gram négatif, qui prennent une coloration finale rose de fuchsine.

La coloration de gramme se fait en deux étapes :

1-**réparation d'un frottis bactérien**: un étalement d'une souche bactérienne aussi mince que possible est effectué à l'aide d'une anse stérile dans une goutte d'eau distillée déposée sur une lame, cette dernière est séchée à l'aide d'un bec benzène.

2- **Coloration de Gram**: cette lame est recouverte de **crystal violet** pendant 1minute, ensuite de **Lugol** pendant 1 minute, puis d'alcool pendant 10 secondes et par le **rose de Fuscine** pendant 1minute. Un rinçage de la lame à l'eau courante après chaque étape est obligatoire. Et puis observation au microscopique.

- **Test d'oxydase :**

Ce test permet l'identification des bactéries Gram négatif, il met en évidence la présence d'une enzyme la phénylène diamine oxydase qui oxyde le réactif N-diméthyle paraphénylène diamine.

À l'aide de l'anse, en incorpore une colonie sur le disque d'oxydase. Si le test est positif le disque donne une coloration rose-violette en peut alors conclure que c'est

**Pseudomonas aeruginosa.**

- **Identification par les tests biochimiques et confirmation par la galerie API 20.**

Les milieux d'identification permettent l'étude du métabolisme biochimique bactérien :

- **Hajna kligler :**

Milieu complexe qui permet la recherche de plusieurs caractères biochimiques, tel que : la dégradation du glucose et lactose (virage du rouge au jaune), soit en aérobie ou anaérobie, production de H<sub>2</sub>S et libération de gaz.

- **Citrate de Simmons :**

Ce milieu permet de mettre en évidence l'utilisation du citrate par les bactéries Comme source de carbone et d'énergie. Dans ce cas, le milieu va virer du vert au bleu, le BBT Permet de mettre en évidence une alcalisation en cas d'utilisation de citrate.

- **RM :**

Ce milieu permet de mettre en évidence les bactéries qui produisent des acides organiques par la voie des acides mixtes, La révélation se fait par le rouge de méthyle (coloration rouge =RM positif).

- **Urée -tryptophane :**

Milieu qui permet de mettre en évidence les bactéries qui dégrade l'urée par l'uréase et ceux qui produisent l'indole par la tryptophanase, La présence de l'indole est révélée par le réactif de Kovacs.

- **Identification par Galerie Api 20E :**

L'Api 20E est un système standardisé pour l'identification des *Enterobacteriaceae* et autres bacilles Gram-négatifs non fastidieux, elle comporte 21 tests biochimiques miniaturisés, ainsi qu'une base de données. Son principe est basé sur une fermentation et une oxydation de 10 sources de carbone et l'utilisation de 10 tests enzymatiques par *Enterobacteriaceae* gram négatifs

L'Api 20E comporte 20 micro-tubes contenant des substrats déshydratés. Les micro-tubes sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les tests. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages

colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. La lecture des réactions se fait à l'aide du tableau de lecture et l'identification est obtenue à l'aide du catalogue analytique ou d'un logiciel d'identification.



Figure 3 : exemple d'une galerie de l'API 20 E

### Mode opératoire:

Pour ensemer une Api 20E, on passe par les étapes suivantes:

a- **Préparation de la Galerie:** D'abord inscrire la référence de la souche dans la languette latérale de la boîte fermée. Ensuite créer une atmosphère humide en répartissant 5mL d'eau distillée dans les alvéoles du fond de la Galerie et la placer dans la boîte d'incubation.

b- **Préparation de l'inoculum:** Réaliser une suspension bactérienne bien homogène par ensemencement d'une colonie provenant d'une culture jeune (18 à 24h) dans un tube stérile contenant 5ml d'eau physiologique stérile à opacité entre 0,45 et 0,55 Macfarland.

c- **Inoculation de la Galerie:** Introduire la suspension dans la galerie: on crée l'anaérobiose en remplissant leurs cupules avec l'huile de paraffine, pour les tests CIT, VP, GEL, on remplit les tubes et les cupules et enfin pour les autres tests non soulignés on remplit uniquement les tubes. Ensuite, on met la boîte d'incubation dans l'étuve à 37° C pendant 24h.

d- **Lecture de la Galerie :** Elle doit se faire en se référant au tableau de lecture. Les tests: TDA, IND et VP sont révélés après addition des réactifs: on ajoute une goutte du réactif

JAMES pour le TDA et on ajoute une goutte des réactifs VP1 et VP2 pour les tests IND et VP.

Pour l'identification des staphylocoques on a eu recours aux tests suivants :

- **Test de coagulase :**

Ce test permet l'identification de *Staphylococcus aureus*.

La technique consiste à mettre dans un tube à hémolyse 0,5 ml de plasma oxalaté +0,5 ml de culture microbienne enrichis au BHI, puis incubation à 37 °C en veillant à ne pas incliner ,ni faire bouger les tubes à hémolyse réaliser. La lecture se fait dans les 6h qui suivent le test. Elle se manifeste par une coagulation en cas de présence de

*Staphylococcus aureus*.

- **Test de catalase :**

Ce test permet l'identification des bactéries Gram positif, il met en évidence la présence d'une enzyme : la catalase, qui catalyse les peroxydes en eau avec libération d'oxygène.

Sur une lame, on met une goutte d'eau oxygéné dans laquelle on dépose une colonie bactérienne. Si on a une effervescence, ceci indique un dégagement gazeux de dioxyde donc une catalase positive.

• **Antibiogramme**

Nous avons réalisé 3 types d'antibiogrammes, des antibiogrammes pour les

*Entérobactéries*, les *Staphylococcus aureus* et pour les *Pseudomonas aeruginosa*.

La réalisation de l'antibiogramme se fait en 3 étapes :

Préparation de l'inoculum : Réaliser une suspension bactérienne bien homogène par ensemencement d'une colonie provenant d'une culture jeune (18 à 24h) dans un tube stérile contenant 5mL d'eau physiologique stérile. afin de préparer une suspension d'opacité 0,5 sur l'échelle de macfarland

Ensemencement en tapis sur milieu Mueller Hinton(MH) :

A l'aide d'un écouvillon stérile étaler la suspension sur la gélose par des stries serrées 3 fois afin de recouvrir toute la surface de gélose.

### Disposition des disques d'antibiotiques :

A l'aide d'une pince stérile, déposer les disques d'antibiotiques correspondant à la souche traitée sur la gélose (7 disques pour chaque boîte de pétri)

#### • PCR

En microbiologie moléculaire la PCR est utilisé pour soit identifier des bactéries,ou isoler des gènes de résistance.

La PCR comporte trois étapes :

Une **dénaturation** de l'ADN par chauffage pour séparer les deux brins qui le composent ,suivie d'une **hybridation** des amorces au extrémités de la séquence recherchée. Puis **une élongation** grâce à l'action de la **Taq polymérase** . Ce cycle est répété un grand nombre de fois pour obtenir une multiplication exponentielle de la séquence d'ADN cible.

La révélation se fait par électrophorèse sur gel d'agarose.



Figure 4 :résultat d'une électrophorèse sur gel d'agarose

# Introduction

---

De multiples infections, parfois grave, peuvent être contractées au cours d'un séjour dans un établissement de santé. Ces infections contractées sont appelées infections nosocomiales. Elles peuvent être dues à une contamination par du sang , comme elles peuvent être dues à l'eau intervenant dans ces établissements dans de nombreux actes, constituant ainsi un réservoir pour de nombreux germes pathogènes, qui se propagent facilement à travers le corps.

La maîtrise de la qualité de l'eau, permet de faire diminuer en quelque sorte la prévalence des infections. N'étant pas l'unique responsable des infections recueillit au cours des séjours hospitaliers, cela dit la qualité de l'eau, celle de l'air et des surfaces doivent faire l'objet d'une attention particulière dans la lutte contre les infections nosocomiales dans les établissements de soins. Cette attention doit être pour plus autant justifier par des textes réglementaires la concernant.

Ceci est due aux non-respects des mesures d'hygiène, c'est pour cela que pour mon projet de fin d'études j'ai traité un sujet autour de la qualité de l'eau de soins standards au sein du complexe universitaire Hassan II. Nous nous sommes intéressées dans un premier temps, à l'analyse microbiologique d'un échantillon d'eau de soins standards , et dans un deuxième temps, à la validation de la qualité de cette eau en ce référent aux normes et aux législations.

# Partie I :

## Revue

# Bibliographique

## I.EAU A USAGE MÉDICALE

---

### 1-Définition :

L'eau à usage médical définit toute eau utilisée pour l'assainissement et l'hygiène dans un milieu hospitalier. Selon l'OMS l'existence de services d'eau, d'assainissement et d'hygiène dans les établissements de santé permet de prévenir les infections et la propagation des maladies, de protéger le personnel et les patients et de préserver la dignité des populations vulnérables, dont les femmes enceintes et les personnes handicapées. Pourtant, dans les pays à revenu faible, ces services ne sont pas assurés dans beaucoup d'établissements de santé, ce qui compromet la capacité de ces derniers à offrir des soins de qualité et entraîne des risques sérieux pour la santé des personnes qui viennent se faire soigner.

### 2-typologie de l'eau

L'eau est un produit dont la qualité intrinsèque varie selon l'usage (alimentaire, sanitaire, médical ou technique). La qualité d'une eau se définit à partir de ses caractéristiques microbiologiques et physico-chimiques. De plus, elle doit être en accord avec la réglementation adaptée à son utilisation.

On distingue :

### 1- les eaux ne subissant aucun traitement dans l'établissement de santé

#### 1.1-eau à usage alimentaire

Définie comme toute eau utilisée pour boire ou pour préparer des aliments, cette dernière correspond à :

- L'eau de distribution publique,
- L'eau des puits
- Les eaux conditionnées,

#### 1.2- les eaux pharmaceutiques inscrits à la pharmacopée

Eau utilisée dans l'industrie pharmaceutique ou plus simplement lors de la préparation de la grande majorité des médicaments, utilisée aussi en tant qu'excipient,

pour reconstituer un médicament, la formulation du produit fini ou comme élément principal de nettoyage des cuves, des équipements ou des emballages primaires.

Différentes qualités d'eau sont nécessaires, selon l'utilisation qui en serait faite. Les différentes qualités d'eau se remarquent par leur pureté chimique et microbiologique, on peut citer :

- L'eau purifié;
- Eau pour préparations injectables;
- Eau pour dilution des solutions concentrées pour Hémodialyse;

## **2- les eaux traitées au sein de l'établissement de santé, répondant à des critères définis En fonction des usages alimentaires, sanitaires et de soins :**

### **2.1- Eau bactériologiquement maîtrisée**

Les eaux « bactériologiquement maîtrisées » sont des eaux obtenues dans les établissements de santé, à partir de l'eau potable dont la qualité microbiologique a été améliorée, après traitement par la microfiltration, sur membranes minérales (alumine ou oxyde de zirconium), sur membranes en acétate de cellulose ou sur membranes en polymères de synthèse non cellulosique (type polysulfone) ayant des seuils de rétention absolue de 0.2 à 0,45 µm. Ce qui contribue à la diminution du nombre total de microorganismes, absence de germes pathogènes.

Ces eaux sont destinées aux patients les plus vulnérables ainsi que pour des soins au contact des muqueuses ou exposant à un risque infectieux particulier, utilisée aussi pour le rinçage terminal des instruments médicaux non autoclavables (type endoscope), le lavage chirurgical des mains, éventuellement les soins médicaux et chirurgicaux. Elle ne doit jamais se substituer à l'eau stérile, en particulier pour des actes thérapeutiques ou d'hygiène dispensés à des patients à risque (brûlés, immunodéprimés, ...).

Selon le ministère de la santé et des solidarités français, Les paramètres microbiologiques retenus pour cette eau sont :

Tableau 1 : paramètre microbiologique retenus pour une eau bactériologiquement maîtrisée.

	Niveau cible	Niveau d'action
Flore aérobie revivifiable à 22°C	≤ 1 UFC / 100 ml	≥ 10 UFC / 100 ml
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	< 1 UFC / 100 ml	≥ 1 UFC / 100 ml

## 2.2-Eau pour soins standards

Eau utilisée pour les soins standards : soins de base pour des patients sans risque particulier, en mélange avec de l'eau chaude pour produire de l'eau mitigée. Elle peut aussi être utilisée pour des usages alimentaires.

Parmi les paramètres microbiologiques retenue pour l'eau de soins standards sont décrits dans le tableau suivant :

Tableau 2 : Paramètre microbiologique pour l'eau de soin standard.

	Niveau cible
Flore aérobie revivifiable à 22°C	≤ 100 UFC / ml
Flore aérobie revivifiable à 36°C	≤ 10 UFC / ml
Coliformes totaux *	< 1 UFC / 100 ml
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	< 1 UFC / 100 ml

\* En présence de coliformes totaux, il est nécessaire de rechercher *Escherichia coli*.

### 2.3-Eau potable stérilisée:

Cette eau est notamment utilisée pour la boisson et pour les préparations alimentaires non cuites, Destinées aux malades immunodéprimés, Conformément aux recommandations du << circulaire DGS/VS4 n°97-413 du 30 mai 1997>>, relative à la microbiologie des eaux destinées à la consommation humaine et au risque parasitaire pour les personnes immunodéprimées. Cette dernière est celle la plus souvent utilisée pour les soins. Elle peut aussi être utilisée Pour le nettoyage et le rinçage de certains dispositifs médicaux, comme par exemple le rinçage terminal des endoscopes en endoscopie ORL, digestive haute et basse, Sauf en cas d'accès à une cavité stérile (cholédoscopie transpariétale

### 2.4- L'eau des piscines de rééducation et bain à remous

Obtenue à partir de l'eau potable, généralement soumise aux mêmes règles de traitements (floculation, filtration, désinfection) que l'eau des piscines à usage récréatif, afin d'être désinfectée et désinfectante. Elle a un usage thérapeutique, lors du traitement de rééducation dans diverses pathologies post-traumatiques, rhumatismales.

Les paramètres microbiologiques recommandés sont représentés dans le tableau ci-dessous :

**Tableau 3 : Paramètre microbiologique pour eau de piscine de rééducation**

Eau des piscines de rééducation		
Paramètres	Niveau exigé	Fréquence
Flore aérobie revivable 36°C*	< 100 UFC/ml	Mensuelle
Coliformes totaux à 36°C*	< 1 UFC/100ml	Mensuelle
Pseudomonas*	< 1 UFC/100ml	Mensuelle
Staphylococcus aureus*	< 1 UFC/100ml	Mensuelle
<b>Complément pour eau des bains à remous</b>		
Legionella pneumophila*	absence	Mensuelle

## **3-les eaux techniques produites au sein de l'établissement de santé**

### **3.1-Eau déminéralisée**

Une eau dans laquelle la quasi-totalité des cations et anions a été éliminée par un traitement de déminéralisation ou déionisation, par passage sur des résines échangeuses d'ions. Cette eau est utilisée pour la préparation de certains réactifs de laboratoire, ainsi que le fonctionnement des analyseurs de biologie. Elle a aussi un usage thérapeutique, pour certaines préparations pharmaceutiques.

### **3.2- Eau distillée**

Obtenu à partir de l'eau potable, après distillation elle devient exempte de tous composé inorganique, stérile et apyrogène.

### **3.3-L'eau osmosée**

L'eau osmosée est obtenue à partir de l'eau potable par passage sur membrane Semi-perméable (en acétate de cellulose ou en polymères aromatiques), soumise à l'action d'une force supérieure à la pression osmotique (osmose inverse). Cette dernière est exempte de substance organique et inorganique. À usage thérapeutique (utilisation comme eau pour la dilution des concentrés pour hémodialyse), soit à usage technique (alimentation d'appareillage de laboratoire, d'autoclaves et d'humidificateurs,)

### **3.4-Eau adoucie**

L'eau adoucie a dureté abaissée due à la réduction de la teneur des ions de magnésiums et de calciums (par passage sur des résines échangeuses d'ions), donc à pouvoir entartrant moindre. Elle a essentiellement un usage technique et va être utilisée au niveau des centrales de chaufferie, des systèmes de climatisations et d'humidificateurs, des tours de refroidissement, Elle ne doit pas être utilisée pour un usage alimentaire.

## **2.4-Eau chaude sanitaire**

Eau potable du réseau d'adduction faisant objet d'un traitement thermique donnant ainsi une eau chaude sanitaire. Destinée au lavage des mains du personnel de santé, pour l'hygiène corporelle des malades, pour l'alimentation des piscines de rééducation. Cette eau ne doit jamais être utilisée pour un usage alimentaire, ni pour le remplissage d'appareils produisant des aérosols (humidificateurs, brumisateurs), elle doit satisfaire les conditions de l'eau potable.

## **II- les risques infectieux liés à l'eau dans établissement de soins**

---

Les infections d'origine hydrique liées aux soins de santé sont principalement causées par ***Legionella et Pseudomonas spp.*** Divers facteurs liés à l'eau et aux caractéristiques de la plomberie, ainsi que l'interaction avec d'autres microorganismes présents dans l'eau, sont considérés comme causes de la contamination. Il est donc obligatoire d'organiser des plans de surveillance, de prévention et de contrôle afin d'éviter l'apparition de maladies chez les patients les plus vulnérables (immunodéprimé,) présentant un risque de décès plus élevé.

-Les ***Pseudomonas spp*** sont des bacilles à Gram négatif, ubiquitaires, présents dans les eaux naturelles telles que les lacs et les rivières. En raison de leur tolérance à une grande variété de conditions physiques et de leurs besoins nutritionnels minimaux. Les *Pseudomonas* peuvent ainsi coloniser les biofilms dans des systèmes artificiels tels que celle de l'eau potable.

***Pseudomonas aeruginosa*** est l'une des principales espèces d'agents pathogènes opportunistes de l'homme appartenant à ce groupe, qui peut causer un large éventail d'infections (**Baghal-asghari et al., 2013**).

Cette dernière infecte typiquement les voies pulmonaires, les voies urinaires, les brûlures et les plaies. Elle reste l'une des principales causes de lésion des plaies ou d'infections nosocomiales des poumons, avec un taux de mortalité important pouvant atteindre 1 400 décès par an de pneumonies nosocomiales aux États-Unis selon

(Anaisie et al., 2002). L'eau contaminée constitue la voie habituelle d'infection (Mena et Gerba, 2009). Ses infections sont contractées par les patients lors de la douche, du bain, contamination par l'eau d'alimentation ou par le simple contact avec du matériel médical rincé avec de l'eau de robinet contaminée (Anaisie et al., 2002).



Figure 5:Pseudomonas spp



Figure 6:Pseudomonas aeruginosa

**-Legionella** est une bactérie d'origine hydrique à Gram négatif, strictement aérobie, mobile, en forme de bâtonnet droit ou courbé, responsable de la pneumonie. actuellement, le genre Legionella comprend 59 espèces, trois sous-espèces et plus de 70 sérogroupes différents, dont moins de la moitié sont des agents pathogènes opportunistes (Euzéby JP., 1997).

**Legionella pneumophila** est l'agent pathogène le plus couramment identifié. Il concerne 83% des cas confirmés par culture en Europe et 99% en Italie. La voie d'infection la plus courante est celle par inhalation d'aérosols contenant la bactérie. Ainsi la légionellose est une maladie d'origine bactérienne, potentiellement mortelle. Elle entraîne une infection pulmonaire aiguë. L'émergence récente de cette maladie s'explique par son affinité pour les systèmes modernes d'alimentation en eau comme les tours de refroidissement, les climatiseurs, les bains à jet, les bains à remous (jacuzzi), les canalisations d'eau chaude, etc.\*

\* <https://www.pasteur.fr/fr/centre-medical/fiches-maladies/legionellose> consulté le 20/05/2019



Figure 7: Legionella pneumophila

Dans les centres hospitaliers, les systèmes d'eau chaude et froide sont les principales sources d'infection **(LinYe et al.,2011)** . Des facteurs tels que la température de l'eau, la configuration et l'âge des systèmes de distribution d'eau, les composants physicochimiques de l'eau et les matériaux de plomberie favorisent la croissance des légionelles **(Borella P et al.,2004)**. les anciens composants du système de canalisation , les zones de stagnation ou de faible débit, les corps morts et les réservoirs de stockage permettent leur survie et leur développement **(Steiner TM et al.,2002)**. Pour résoudre ses problèmes et réduire le risque infectieux , une prévention et des mesures corrective et de contrôle doivent être exigé.

Parmi ses mesures une désinfection continue de l'eau peut être une technique efficace pour réduire les contaminations . Mais malgré ça il faut obligatoirement surveillés tous les systèmes en permanence car aucun système n'élimine les bactéries définitivement et une fois l'eau de réseau contaminé, les niveaux adéquats de biocides devraient être sélectionné afin d'obtenir le meilleur effet avec un minimum de dommages pour les tuyaux. Chaque méthode de désinfection diffère par sa conception et son application, et le choix d'une mesure appropriée et rentable nécessite une analyse et une planification minutieuses.

# Partie II : Matériel et Méthodes

## 1-lieux et période de stage

Mon stage de fin d'études a été réalisé au sein du laboratoire de microbiologie et biologie moléculaire, de la faculté de médecine et de pharmacie de Fès. Mon travail a été principalement réalisé dans le laboratoire de microbiologie d'une durée d'un mois et demi, allant du 15 avril au 30 mai 2019.

## 2-Échantiollonage

Le Prélèvement d'eau a été réalisé en mai 2019, à partir d'un robinet dans une salle de désinfection des endoscopes, du service de pneumatologie du Centre Hospitalier Universitaire Hassan II.

## 3-Analyse bactériologique

L'analyse bactériologique de l'eau se limite à la détection de microorganismes sur des milieux spécifiques. Ces microorganismes sont considérés comme des indicateurs de contaminations.

Les méthodes utilisées dans les analyses microbiologique sont les suivantes :

- Membrane filtrante.
- Incorporation en gélose.
- Nombre le Plus Probable.

### ❖ **Méthode de la filtration sur membrane :**

La filtration sur membrane est une technique de numération adaptée pour énumérer des bactéries présentes à des concentrations très faibles dans l'eau. Pour pouvoir dénombrer ces bactéries, il est alors nécessaire d'analyser des volumes d'eau importants.

### **3-1. Analyse des eaux traitées**

L'analyse bactériologique de l'eau traitée est effectuée par la technique de la membrane filtrante et celle de l'incorporation en gélose. Cette analyse est réalisée 1 fois / trimestre.

### **3-2. Milieu de culture :**

On utilise la gélose pour dénombrement, ou PCA (Plate Count Agar) standard, milieu utilisé pour le dénombrement des microorganismes aérobies revivifiables, aussi nommés FMAR. C'est un milieu nutritif sans inhibiteurs, dont l'intérêt est de favoriser le développement à 30 °C de tous les micro-organismes qu'on y a déposés.

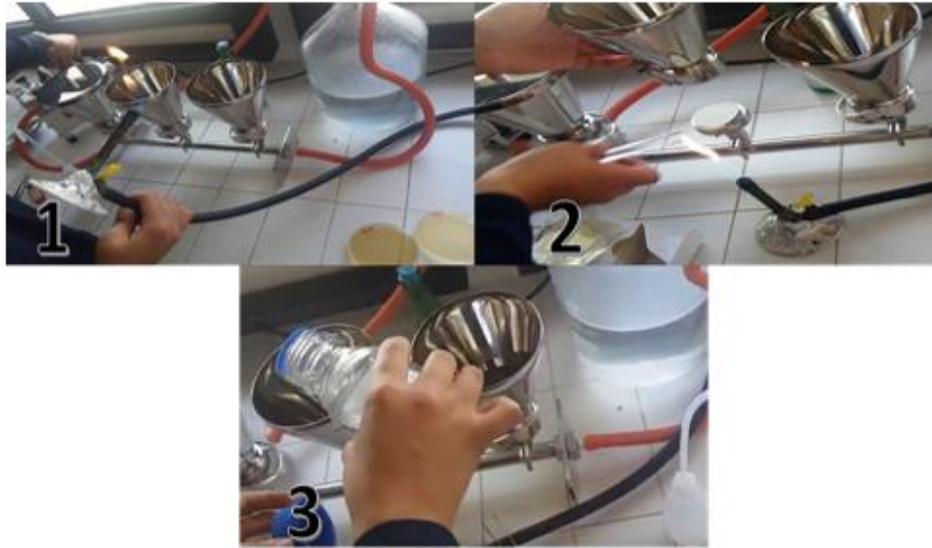
### **3-3. Protocole de la filtration**

Après l'échantillonnage, une fois au laboratoire on procède à la préparation et la stérilisation du matériel de travail pour commencer notre filtration.



**Figure 8: Matériel utilisée pour la filtration**

Les étapes de la filtration se présente comme suit :



**Figure 9** : les étapes de la filtration sur membrane

1-On commence par flamber la face supérieure (plaque poreuse) de l'appareil de filtration . Fermer le robinet du support et mettre en marche la pompe à vide.

2-Prélever une membrane stérile en la saisissant par son bord extérieur, avec une pince flambée et refroidie. On la déposer sur la plaque poreuse. L'entonnoir réservoir flambé et refroidi est placé au-dessus de la membrane. Le dispositif de fixation installer.

3- Agiter soigneusement le flacon d'eau à analyser et verser l'eau, stérilement, dans le réservoir jusqu'au repère (100 ml). Ouvrir le robinet du support suffisamment pour laisser l'eau s'écouler lentement sous l'action du vide, jusqu'à fin de la filtration.

Dès que la membrane paraît sèche, fermer le robinet, enlever le dispositif de fixation et, avec la pince à creuset, le réservoir. Prélever la membrane avec une pince flambée en la saisissant par son extrême bord, et l'introduire dans le milieu de culture PCA. - puis on incube à 30°C, lecture à 48 heures, 72 heures et 5 jours en cas de culture stérile.



**Figure 10** : mise en culture du filtre sur milieu de culture PCA

# Partie III : Résultat et discussion

## I-Résultat des analyses bactériologiques de l'eau

---

### 1.Eau de soins standards :

L'utilisation de l'eau et plus spécifiquement dans un hôpital , implique plusieurs risques infectieux pour les patients en tous genres (immunodéprimé, femme enceinte, enfant, personnes âgées ) ainsi que le personnel.

Pour contrôler la qualité et l'innocuité des eaux de soins ,on prélève un partir d'un point d'eau de l'établissement de santé un échantillon de 100 ml ,on le filtre, puis ensemencer sur gélose PCA pour détecter une présence probable des microorganismes revivifiables à 30°C et des *Pseudomonas aeruginosa* indicatrice de contamination.

Ces analyses bactériologiques vont permettre de déterminer la qualité de cette eau et prouver l'efficacité des traitements d'eau préalable.

### 2-Résultat :

Le résultat de l'analyses bactériologique de l'eau de soins standards sont présentés dans le tableau ci-dessous.

**Tableau 4 : Résultats de la lecture de l'analyse bactériologie de l'eau de soins standards, et du dénombrement des micro-organismes revivifiables à 37°C et *Pseudomonas aeruginosa* après 24 heures, 48 heures et 5 jours d'incubation .**

	Micro-organismes revivifiables	Valeur maximal admissible	<u><i>Pseudomonas aeruginosa</i></u> .	Valeur maximal admissible
24h	0 UFC/100ml	< à 10 UFC/ml	0 UFC/100ml	< à 1 UFC/100ml
48h	0 UFC/100ml	< à 10 UFC/ml	0 UFC/100ml	< à 1 UFC/100ml
5 jours	6 UFC/100ml	< à 10 UFC/ml	0 UFC/100ml	< à 1 UFC/100ml

- ❖ Les résultats de l'analyse bactériologique montrent que l'eau analysée est exempte de *Pseudomonas aeruginosa* et pour les **Micro-organismes revivifiables** après 5 jours d'incubation on obtient **6UFC/100ml**, et qui rentre dans les valeurs admissibles.

❖ Le dénombrement des bactéries aérobies revivifiables, à 37 °C et après 24 heures, doit être inférieur ou égal à 20 UFC/mL d'eau prélevée à 22 °C et après 72 heures, il doit être inférieur ou égal à 100 UFC/mL d'eau prélevée. L'analyse est commencée dans les 12 heures suivant le conditionnement.

(Décret n° 90-363 du 5 avril 1995).

❖ Ces résultats montrent ainsi, que l'eau analysée est conforme aux limites fixées par les normes marocaines de potabilité de l'eau « NM 03.7.001 », vis-à-vis des micro-organismes revivifiables et des *Pseudomonas aeruginosa*.



Figure 11: Résultat après 24h, 48h d'incubation à 37°C

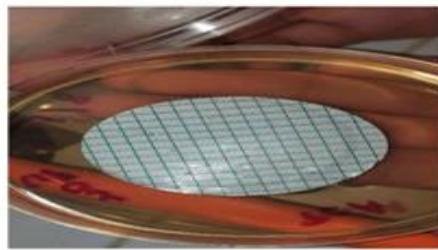


Figure 12: Résultat après 5 jours d'incubation à 37°C

### 3. Discussion

Les résultats obtenus confirment que l'aptitude de l'eau de soins est de bonne qualité et respecte les normes marocaine (NM), est les normes recommandées par l'organisation mondiale de la santé (OMS). En effet, le nombre de micro-organismes revivifiables est très restreint et on remarque l'absence totale de germes de type *Pseudomonas aeruginosa* indicateur de contamination de l'eau.

Ces résultats montrent que l'eau contrôlée est conforme aux valeurs maximales admissibles des paramètres bactériologiques fixés par la norme marocaine « NM 03.7.001 » des eaux potables utilisées dans différents domaines (agroalimentaires, médical,).

## Conclusion

---

Durant ces sept semaines de stage, j'ai traité un sujet à propos de la qualité de l'eau dans le milieu hospitalier. Plus précisément la qualité d'une eau de soins standards. Cette démarche d'assurance qualité et le programme de contrôle réalisés ont permis de conclure que la qualité de cette eau est conforme, dite admissible selon les normes marocaines et les normes recommandées par l'organisation mondiale de la santé. Au cours de ce travail, nous avons comparé les résultats des analyses bactériologiques de l'eau prélevée, destinée aux soins médicaux aux normes. Ces analyses constituent un contrôle préventif du danger et aussi un outil pour montrer l'efficacité des traitements effectués avant la distribution.

## Références

- QUALITE DE L'EAU DANS LES ETABLISSEMENTS DE SANTE, Synthèse bibliographique réalisée par l'Office international de l'eau (1998) pour le DGS.
- Eaux des Établissements de Santé - Qualité de l'eau aux points d'usage. Mai 2003.
- Eau et Santé Guide technique H2O L'eau dans les établissements de santé, **2002**
- Groupe Eau Santé. Eaux à usage médical : qualité de l'eau et endoscopie. Laboratoire Asta Médical, 1999
- Décret n° 89-3 du 3 janvier 1989 relatif aux eaux destinées à la consommation humaine à l'exclusion des eaux minérales naturelles. Modifié par le décret n° 90-330 du 10 avril 1990, par le décret n° 91-257 du 7 mars 1991, par le décret n° 95-363 du 5 avril 1995, par le décret n° 98-1090 du 4 décembre 1998.
- BLECH M.F., HABRIOUX F., HARTEMANN Ph. Les eaux bactériologiquement maîtrisées. Hygiènes, 1998, 6, 398-405.
- L'EAU, L'ASSAINISSEMENT ET L'HYGIÈNE pour de meilleurs services sanitaires dans LES ÉTABLISSEMENTS DE SOINS DE SANTÉ ; Organisation mondial de la santé, Unicef.
- Pharmacopée Française – X° édition.
- [www.eaudumaroc.com/2017/10/les-normes-de-leau-potable.html](http://www.eaudumaroc.com/2017/10/les-normes-de-leau-potable.html) consulté le 10/05/2019
- Guide Technique TRAITEMENT DES ENDOSCOPES SOUPLES THERMOSENSIBLES A CANAUX MINISTERE DES AFFAIRES SOCIALES ET DE LA SANTE, éd 2016
- Baghal Asghari, F., Nikaeen, M., & Mirhendi, H. (2013). Rapid monitoring of Pseudomonas aeruginosain hospital water systems: a key priority in prevention of nosocomial infection. FEMS Microbiology Letters, 343(1), 77–81.
- Euzéby JP, List of bacterial names with standing in nomenclature: a folder available on the Internet.Int J Syst Bacteriol 1997;47: 590-2. Available at: <http://www.bacterio.net> [ consulté le 20/05/2019].

- <https://www.pasteur.fr/fr/centre-medical/fiches-maladies/legionellose> consulté le [20/05/2019](#)
- Lin YE, Stout JJE, Yu VI – controlling *Legionella* in hospital drinking water: an evidence-based review of disinfection methods, *Infect control Hosp Epidemiol* 2011; 32 :166-73
- Borella P, Montagna MT, Romano-Spica V, et al. *Legionella* infection risk from domestic hot water. *Emerg Infect Dis* 2004; 10: 457-64.  
-D'Alessandro D, Fabiani M, Cerquetani F, Orsi GB. Trend of *Legionella* colonization in hospital water supply. *Ann Ig* 2015; 27: 460-6.
- Steiner T M, Hentschel U, Hacker J. *Legionella pneumophila*: an aquatic microbe goes astray. *FEMS Microbiol Rev* 2002; 26:149-62.
- Boudjelida H, Bellal CH "les techniques d'identifications utilisés dans le diagnostic bactériologique".
- Guide technique « L'eau dans les établissements de santé » 2005.