



UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

Projet de Fin d'Etudes

Licence Sciences & Techniques
Sciences Biologiques Appliquées et Santé
(LST - SBAS)

QUALITE MICROBIOLOGIQUE DES EAUX D'HEMODIALYSE

Présenté par : BOLKEMNA GRACE SANTA

Encadré par : Pr El Houssaine HARKI (FST Fès)

Pr Bouchra OUMOKHTAR (FMPF)

Soutenu le : 04/07/2022

Devant le jury composé de :

- **Pr El Houssaine HARKI**
- **Pr Bouchra OUMOKHTAR**
- **Pr Kaouakib EL ABIDA**

Stage effectué à : La Faculté de Médecine et de Pharmacie de Fès

Année universitaire 2021-2022

Dédicace

A mes parents, sources de vie et de motivation.

Je vous dédie ce travail en guise de vos prières et vos nombreux sacrifices à mon égard.

J'espère que vous trouverez dans ce modeste travail, ma profonde reconnaissance et mon amour envers vous.

Puisse Dieu vous bénir et de vous prêter longue vie.

REMERCIEMENTS

En préambule de ce travail, je tiens à remercier Dieu, le tout puissant qui m'a armé de force et de patience durant toutes ces années d'étude.

J'adresse mes sincères remerciements au **Pr Bouchra OUMOKHTAR** et à qui j'exprime ma reconnaissance de m'avoir acceptée dans sa structure, de m'avoir encadrée et conseillée durant mon stage.

Mes remerciements vont également à l'égard du **Pr El Houssaine HARKI**, mon encadrant interne qui m'a accordé sa disponibilité et a su me guider dans la réalisation de ce projet.

Mes vifs remerciements au responsable de notre filière, le **Pr Said HALOTI** pour ses précieuses aides.

J'exprime mes remerciements au **Pr Kaouakib EL ABIDA** d'avoir accepté de juger mon travail.

Je ne saurai terminer sans remercier toutes ces personnes au laboratoire plus particulièrement **M. Salim BELCHKAR** et **M. Moussa BENBOUBKER** pour les connaissances supplémentaires qu'ils m'ont apprises.

LISTE DES ABREVIATIONS

AAMI : Association for the Advancement of Medical Instrumentation

ADN : Acide Desoxyribonucléique

Ap.Os : Après Osmose

Av.Os : Avant Osmose

BHI : Brain Heart Infusion

BR : Boucle Retour

Dial : Dialysat

DO : Densité Optique

EB : Eau Brute

EMB : Eosin Methylene Blue

ISO : Organisation Internationale de normalisation

KP : Klebsilla Pneumoniae

LAL : Lysat d'Améboocyte de Limule

LPS : Lipopolysaccharides

MH : Mueller Hinton Broth

MR-VP : Rouge de Méthyle et de Voges-Proskauer

PCR : Polymerase Chain Reaction

pH : Potentiel d'Hydrogène

pNA : Para-Nitro-Aniline

TSA : Tryptone Soja Agar

UE : Unité Endotoxine

UFC : Unité formant colonie

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Procédés de traitement de l'eau pour hémodialyse	5
Figure 2 : Différents filtres d'eau.....	5
Figure 3 : Structure du biofilm	9
Figure 4 : Localisation des endotoxines	10
Figure 5 : Dispositif de filtration sur membrane	15
Figure 6 : Lecteur de microplaque.....	15
Figure 7 : Test de catalase	17
Figure 8 : Test d'oxydase	17
Figure 9 : Test de coagulase	18
Figure 10 : Exemple de la galerie API 20E.....	18

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Standards chimiques	6
Tableau 2 : Normes bactériologiques de l'eau pour hémodialyse	7
Tableau 3 : Résultats du comptage bactérien.....	20
Tableau 4 : Résultats de la quantification des endotoxines	20

SOMMAIRE

PRESENTATION DE LA STRUCTURE D'ACCUEIL	
INTRODUCTION	1
CHAPITRE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	2
1 L'INSUFFISANCE RENALE CHRONIQUE	3
2 LES PRINCIPES DE LA DIALYSE.....	3
3 LA QUALITE DE L'EAU POUR HEMODIALYSE	4
3.1 LES PROCEDES DE TRAITEMENT DE L'EAU	4
3.2 LES NORMES CHIMIQUES.....	6
3.3 LES NORMES MICROBIOLOGIQUES.....	6
4 LA CONTAMINATION MICROBIENNE	7
4.1 LES TYPES DE MICROORGANISMES DANS LE SYSTEME DE DIALYSE	7
4.2 LES SITES DE PROLIFERATION MICROBIENNE	7
4.3 LE DEVELOPPEMENT DU BIOFILM DANS L'EAU DE DIALYSE	8
5 LES ENDOTOXINES.....	9
5.1 DEFINITION ET PROPRIETES	9
5.2 TEST POUR DETECTER ET QUANTIFIER LES ENDOTOXINES.....	10
5.2.1 La gélification.....	10
5.2.2 La turbidimétrie.....	10
5.2.3 Le chromo génique.....	11
6 MOYENS DE PREVENTION DE LA PROLIFERATION DES MICROORGANISMES.....	11
6.1 LA DESINFECTION INTERNE DU CIRCUIT	11
6.1.1 La désinfection chimique.....	11
6.1.2 La désinfection thermique	11
6.1.3 La désinfection thermochimique.....	11
6.2 LA DESINFECTION DES COMPOSANTS EXTERNES DU CIRCUIT ET LES SURFACES DU GENERATEUR.....	12
6.3 LE TRAITEMENT DU TUYAU RELIANT LA BOUCLE DE DISTRIBUTION AU GENERATEUR DE DIALYSE.....	12
CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES	13
1 MATERIEL	14
1.1 PHASE PRE-ANALYTIQUE.....	14
1.2 PHASE ANALYTIQUE	14

1.2.1	Les appareils	14
1.2.2	Les réactifs.....	15
2	DENOMBREMENT DES BACTERIES	16
3	QUANTIFICATION DES ENDOTOXINES : Test de LAL.....	16
4	TESTS D'IDENTIFICATION DES BACTERIES	17
CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION		19
1	RESULTATS	20
2	DISCUSSION	21
CONCLUSION GENERALE		22
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES		23
ANNEXE		25

PRESENTATION DE LA STRUCTURE D'ACCUEIL

Mon stage a été effectué au Laboratoire de « **Microbiologie et Biologie Moléculaire** » au sein de la faculté de Médecine et de Pharmacie de Fès. Il fait partie du laboratoire de recherche en **Pathologie humaine, biomédecine et environnement**.

Ce laboratoire se compose de plusieurs équipes de recherche qui sont :

- Anatomie pathologique
- Eléments traces métalliques
- Génomique et santé
- Maladies de l'appareil digestif
- Microorganismes et facteurs oncogènes
- Physiologie et nutrition
- Etc.

Les différentes structures du laboratoire de « **microbiologie et biologie moléculaire** » sont :

- Une salle de **préparation des milieux de culture et ensemencement**
- Une salle pour **réaliser la PCR**
- *Une salle d'extraction d'ADN pour la biologie moléculaire*
- Une salle pour **électrophorèse**
- Une salle pour **la manipulation sous la hotte**.
- Trois bureaux et une salle pour les doctorants.

INTRODUCTION

Dans le domaine médicale, la dialyse appelée autrement hémodialyse est un processus qui sert à purifier le sang des personnes souffrant d'une insuffisance rénale chronique. Chez les personnes atteintes de cette maladie, les reins se trouvent dans l'incapacité d'assurer leur fonction qui est de filtrer le sang des déchets, de réguler l'équilibre hydrique et électrolytique. L'hémodialyse se base sur l'échange entre deux solutions, le plasma et le liquide de dialyse à travers une membrane semi-perméable. Le dialysat entre ainsi donc en contact avec le sang du patient.

L'unité de dialyse du service de Néphrologie au CHU Hassan II de Fès assure la prise en charge des patients insuffisants rénaux chroniques et effectue en moyenne des séances de désinfection tous les trois mois. Cependant que peut-on attendre de la qualité microbiologique de ces eaux d'hémodialyse?

Le but de ce travail est d'étudier la qualité microbiologique des eaux d'hémodialyse mais aussi de s'assurer qu'elle soit conforme aux recommandations.

Notre travail présente trois parties :

- une synthèse théorique sur la qualité microbiologique de l'eau d'hémodialyse.
- une partie concernant le matériel et les méthodes utilisées.
- on détaillera ensuite les résultats et discussion dans la dernière partie.

CHAPITRE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1 L'INSUFFISANCE RENALE CHRONIQUE

La maladie rénale chronique est une diminution progressive de la capacité des reins à filtrer les déchets du sang de l'organisme. Elle résulte le plus souvent d'un diabète ou d'une hypertension artérielle endommageant ainsi les petits vaisseaux rénaux(1).

L'incapacité des reins à assurer leur fonction peut entraîner d'autres maux dans le corps comme :

- Baisse de production des globules rouges (anémie)
- Défaut d'excrétion des acides (acidose)
- Déséquilibre hydrique d'où une urine concentrée
- Augmentation du taux d'acide urique causant la goutte
- Inflammation du péricarde (péricardite)
- Rétention d'eau et de sodium à l'origine d'une tension artérielle élevée et d'une insuffisance cardiaque.

A l'état avancé de la maladie, les traitements préconisés sont la dialyse ou une greffe de rein. La dialyse aide à rétablir la fonction rénale que temporairement puisque les séances se font trois fois par semaine et durent généralement quatre heures(2).

2 LES PRINCIPES DE LA DIALYSE

Le terme «dialyse ou hémodialyse » englobe l'ensemble des modalités d'épuration extrarénale capables de restaurer périodiquement le « milieu intérieur » de patients insuffisants rénaux chroniques résultant de la défaillance de leurs fonctions excrétrices.

Il fait appel à différentes modalités techniques (hémodialyse, hémofiltration, hémodiafiltration) qui font intervenir des principes physiques élémentaires (diffusion, convection, adsorption) et qui ont en commun une circulation sanguine extracorporelle, un module d'échange entre le milieu intérieur et le milieu extérieur (hémodialyseur), et une solution électrolytique vectrice des échanges. Pendant la dialyse, le sang se trouve d'un côté de la membrane/du filtre et un liquide spécial appelé dialysat (contenant de l'eau, des électrolytes et des minéraux) se trouve de l'autre côté. Les petits déchets se trouvant dans le sang passent à travers la membrane/le filtre pour se retrouver dans le dialysat.

3 LA QUALITE DE L'EAU POUR HEMODIALYSE

3.1 LES PROCEDES DE TRAITEMENT DE L'EAU

L'eau qui sert à préparer le dialysat provient généralement des réseaux de distribution de la ville donc contient des substances minérales et organiques impures. Elle nécessite plusieurs traitements pour répondre aux normes physico-chimiques et microbiologiques définies par la pharmacopée européenne.

Pour obtenir une eau de qualité, l'eau doit subir plusieurs procédées en passant par différents filtres puis sur des osmoseurs pour éliminer toute toxicité.

-le prétraitement commence par un **filtre sur sable**, ce qui permet de stopper toutes les grosses particules ;

- une étape qui permet de réduire la dureté de l'eau, c'est-à-dire éliminer les ions calcium et magnésium, on utilise un **adoucisseur**. Ce dernier est constitué d'une résine cationique et d'une section de stockage de sodium. Le principe consiste à faire passer l'eau dans cet adoucisseur qui, grâce à ses constituants (résines et section de stockage de sodium) va effectuer un échange des ions sodium contre les ions calcium ou magnésium. Une fois que tous les ions sodium sont échangés, la résine est régénérée par une solution de chlorure de sodium. Ceci permet de protéger la membrane pour l'étape d'osmose inverse à venir en neutralisant la dureté d'eau et éviter la précipitation du carbonate de calcium.(3)

-ensuite, on utilise un **filtre à charbon actif (cartouche ou colonne)** pour l'élimination des ions chlores par une réaction catalytique et la filtration des particules et colloïdes. Il permet également l'élimination des micropolluants organiques (produits pyrogènes) et des métaux lourds grâce à son pouvoir absorbant(4) ;

- le traitement de l'eau est une osmose inverse. Grace à l'**osmoseur**, on applique une pression supérieure à celle de la solution à purifier (solution de sel) à travers une membrane semi-perméable ; ce qui permet le passage de l'eau de la solution la plus concentrée à la moins concentrée. L'objectif étant de faire une épuration totale des bactéries, des endotoxines, des particules minérales et organiques même si l'efficacité n'est jamais absolue.

T r a i t e m e n t H D , e a u	Procédé	Produits éliminés	Éléments retenus
	Pré filtration	10µ	Ca ⁺⁺ Mg ⁺⁺ Cl ₂ Na ⁺ K ⁺ SO ₄ ⁻ NH ₄ ⁺ NO ₃ ⁻ F ⁻ Cl ⁻ Métaux H ⁺ OH ⁻
	Adoucisseurs	Ca ⁺⁺ Mg ⁺⁺	Cl ₂ Na ⁺ K ⁺ SO ₄ ⁻ NH ₄ ⁺ NO ₃ ⁻ F ⁻ Cl ⁻ Métaux H ⁺ OH ⁻
	Charbon actif	Cl ₂ Métaux	Ca ⁺⁺ Mg ⁺⁺ Na ⁺ K ⁺ SO ₄ ⁻ NH ₄ ⁺ NO ₃ ⁻ F ⁻ Cl ⁻ H ⁺ OH ⁻
	Filtration	1µ	Na ⁺ K ⁺ SO ₄ ⁻ NH ₄ ⁺ NO ₃ ⁻ F ⁻ Cl ⁻ H ⁺ OH ⁻
	Osmose inverse	Sels ionisés Germes endotoxines	H ⁺ OH ⁻

Figure 1 : Procédés de traitement de l'eau pour hémodialyse

Hormis ces étapes, il convient de mentionner que l'eau est passée par une cascade de micro filtres dont le dernier est un filtre de 0,22 µm juste après l'osmose. Il permet la rétention des bactéries

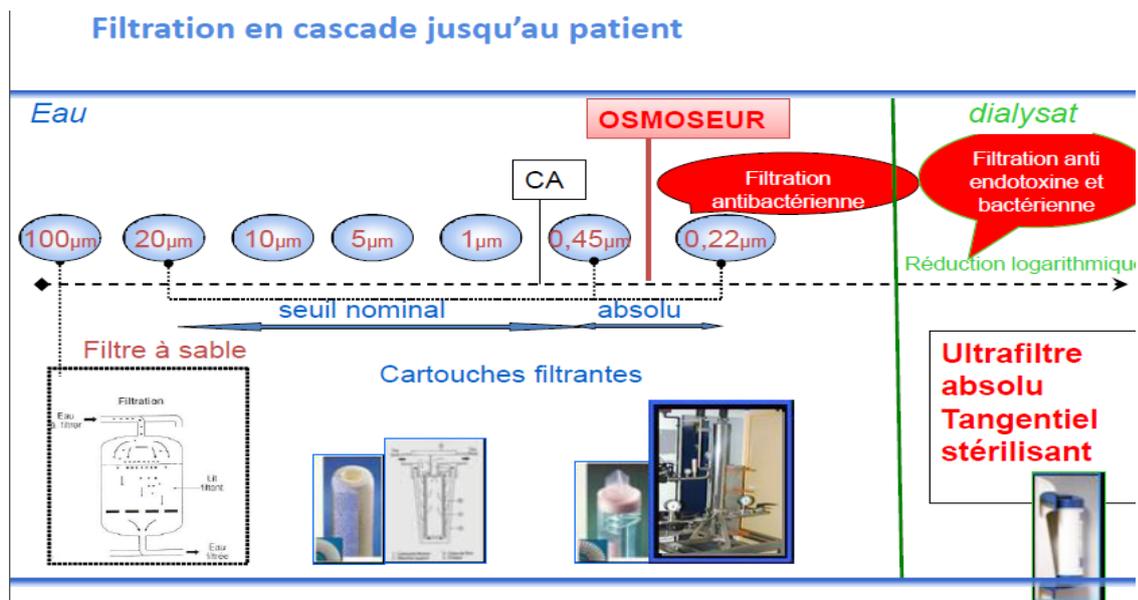


Figure 2 : Différents filtres d'eau(5)

L'eau ainsi traitée circule dans les tuyaux de la boucle de distribution jusqu'aux machines de dialyse où elle subit l'ultrafiltration afin d'éliminer toutes sortes de bactéries et d'endotoxines.

3.2 LES NORMES CHIMIQUES

Pour assurer une eau de qualité pour hémodialyse, un contrôle régulier doit être fait pour certains électrolytes :

Les ions sodium, potassium, calcium, chlorure, nitrate, nitrite, fluorure ou les métaux lourds comme l'aluminium doivent suivre un contrôle mensuel. Le pH quant à lui doit être contrôlé hebdomadairement.

Le contrôle se fait en tenant compte des limites ci-dessous :

Tableau 1 : Standards chimiques

Elément	Limites (concentration en mg/l) définies par la pharmacopée européenne(6)	Limites (concentration en mg/l) définies par le Maroc(7)
Calcium	2	2
Nitrate	2	2
Magnésium	2	4
Potassium	2	8
Sodium	50	70
Plomb	0,1	--
Zinc	0,1	0,1
Chlore	0,1	--
Fluorure	0,2	0,2
Aluminium	0,01	0,01
Nitrite	0,005	--
pH	4,4-7,4	--

3.3 LES NORMES MICROBIOLOGIQUES

Cette qualité doit respecter les normes fixées par la pharmacopée européenne(8). Ainsi le dialysat doit contenir :

- moins de 100 UFC/ml de contaminants bactériens ;
- moins de 0,25 UE/ml d'endotoxines ;
- une absence totale de *Pseudomonas aeruginosa*

Ces standards bactériologiques sont les mêmes que ceux définis par le royaume du Maroc(7).

Tableau 2 : Normes bactériologiques de l'eau pour hémodialyse

Liste des paramètres	MAROC*	Pharmacopée Européenne 7ème Edition 2011		Norme ISO 23500 Mai 2011
			AAMI**	
Bactéries	<100 CFU/ml	<100 CFU/ml CFU/ml (liquide ultrapur)	<200 UFC/ml + niveau d'intervention à 50 UFC/ml	
Endotoxines	<0.25 UI/ml	<0.25 UI/ml 0.03 0.001	<2 EU/ml+ niveau d'intervention à 1 EU/ml	<0.25 UI/ml
*Article 9 de l'arrêté du ministre de la santé N° 808-02 du 27 février 2003				
** Association for the Advancement of Medical Instrumentation				

4 LA CONTAMINATION MICROBIENNE

4.1 LES TYPES DE MICROORGANISMES DANS LE SYSTEME DE DIALYSE

Les contaminants microbiens dans le système de dialyse peuvent aussi bien être des levures, champignons filamenteux que des substances biologiquement actives comme des endotoxines. Cependant, les bactéries à gram- dont 50% du genre *Pseudomonas aeruginosa* sont les plus fréquemment rencontrées dans les fluides de dialyse. On rencontre également des genres comme *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus sp*, *Enterobacter cloacae*, *Micrococcus*, *Serratia*, *Bacillus sp*, *Corynebacter...* (9)

Quant aux champignons et levures, une étude réalisée et publiée en 1990 par l'équipe américaine de Klein a démontré qu'*Exophiala jeanselmei*(champignon) et *Candida parapsilosis*(levure) étaient les espèces les plus retrouvées dans les liquides de dialyse(8).

4.2 LES SITES DE PROLIFERATION MICROBIENNE

La contamination du liquide de dialyse par des bactéries peut se produire dans n'importe quel site du système de traitement de l'eau.

Dans les dispositifs de purification de l'eau, les bactéries se développent dans des cavités profondes des résines, ce qui devient difficile de les éliminer même après un nettoyage. Le

charbon actif par exemple, constitue un site important de prolifération des bactéries grâce à ses micropores où les microorganismes s'y logent.

Le réservoir servant de stockage d'eau pour continuer l'hémodialyse en cas de dysfonctionnement du système est impliqué aussi dans l'accroissement des microorganismes et cela est dû à la stagnation de l'eau(10). Les filtres bouchés et abimés y sont impliqués aussi.

En plus de ces sites, la source de prolifération peut provenir du type d'appareil de dialyse utilisé, du non-respect des mesures d'hygiène et de la fréquence de désinfection des appareils.

4.3 LE DEVELOPPEMENT DU BIOFILM DANS L'EAU DE DIALYSE

Les biofilms sont des couches de microorganismes enrobés dans une matrice extracellulaire adhésive et protectrice(11). Ils adhèrent le plus souvent à la paroi de la boucle de distribution, mais aussi, dans les surfaces en contact avec l'eau (pores). Ainsi, les biofilms impactent la qualité microbiologique de l'eau(12) et présentent une résistance aux antimicrobiens grâce aux propriétés structurelles et fonctionnelles de leur matrice.

Au travers des études(13) , il a été démontré qu'une diminution du chlore dans l'eau augmenterait la formation de biofilm ; or une quantité élevée de chlorure impliquerait une mauvaise qualité d'eau pour hémodialyse.

En plus, plusieurs expériences ont démontré que les zones stagnantes d'eau dans le circuit, les conditions aérobies favorisent grandement le développement des biofilms. La formation du biofilm par les souches de *Pseudomonas aeruginosa* en aérobiose par exemple est accentuée par la présence du calcium(14).

Il convient de rappeler que le biofilm, une fois formé, est difficile à éradiquer par les méthodes de désinfection comme la chaleur ou les produits chimiques ; les méthodes préventives restent une alternative efficace.

Ainsi, afin de réduire les risques de formation de biofilm et assurer une bonne qualité d'eau, il faut prendre en compte la conception et l'entretien des appareils de traitement mais aussi la maîtrise de la qualité microbiologique de l'eau depuis sa captage jusqu'à sa distribution.

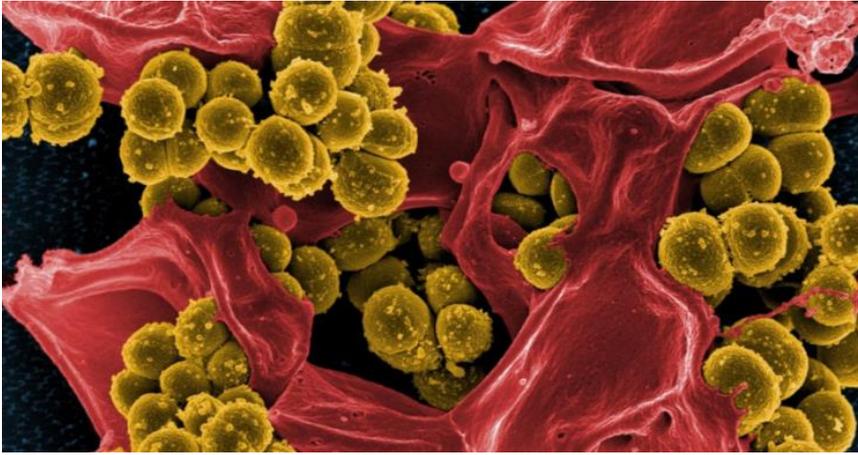


Figure 3 : Structure du biofilm(15)

5 LES ENDOTOXINES

5.1 DEFINITION ET PROPRIETES

Les endotoxines sont des fragments de bactérie libérées par la lyse cellulaire et capables de provoquer un dysfonctionnement de certaines cellules. Elles sont localisées dans la membrane de la paroi externe des bactéries gram-.

Ce sont des molécules de nature lipopolysaccharides (LPS) qui sont constituées d'une partie lipidique (lipide A responsable de la pyrogénicité) et d'une partie polysaccharidique(15). Elles sont :

- thermostables : résistantes à la chaleur ;
- pyrogènes : donnent la fièvre
- peu immunogènes : il n'y a pas d'anticorps efficaces contre elles.

Une fois dans le sang, les endotoxines sont capables de provoquer des réactions pyrogènes conduisant à des complications graves voir même mortelles des patients.

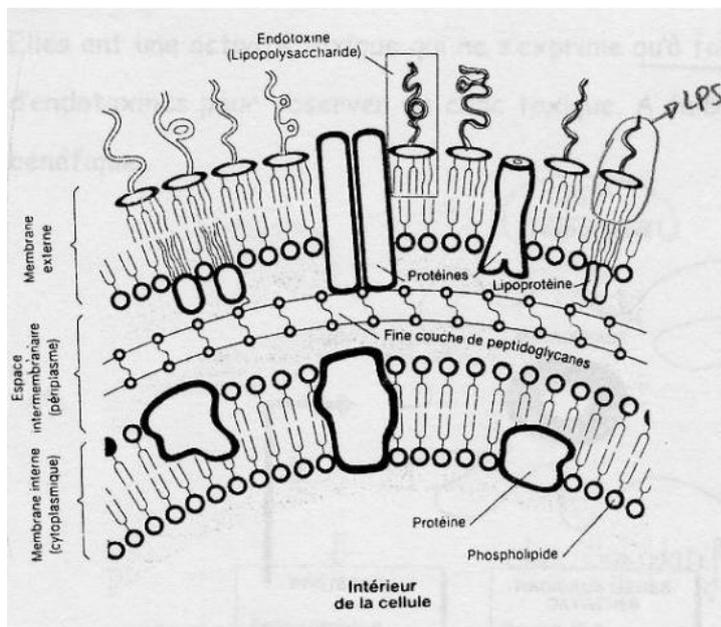


Figure 4 : Localisation des endotoxines

5.2 TEST POUR DETECTER ET QUANTIFIER LES ENDOTOXINES

Le Lysat d'Améboocyte de Limule (LAL) est un réactif qui permet de doser les endotoxines bactériennes. Il contient des enzymes qui sont activées par une série de réaction en présence d'endotoxines aboutissant à la coagulation. Cette dernière contient de la coagulase dont la quantité est proportionnelle à la concentration en endotoxines. Selon l'aspect du produit que donne le LAL en présence d'endotoxines, on a défini plusieurs méthodes dont la gélification, la turbidimétrie et le chromo génique(16).

5.2.1 La gélification

Elle met en évidence la capacité du LAL à coaguler une quantité minimale d'endotoxine. On met une même quantité de LAL et de l'échantillon à tester dans les tubes en verre apyrogènes puis on incube pendant 1H à 37°C. La réaction est positive s'il y a présence du gel après l'incubation.

5.2.2 La turbidimétrie

Elle permet de déterminer la concentration en endotoxine à partir des agglomérats qu'elles forment lorsqu'elles sont en présence d'une solution très diluée de LAL. Cette concentration est déterminée en réalisant une courbe étalon à l'aide des dilutions successives d'une concentration mère en endotoxine.

5.2.3 Le chromo génique

Dans cette méthode, le LAL est combiné à une substance chimique qui est le para-nitro-aniline (pNA). Sous l'action de la coagulase, les deux composés se scindent et le pNA ainsi libéré est mesuré par spectrophotométrie à 405 nm. La concentration en endotoxines est jugée en fonction de la vitesse de la libération du pNA.

6 MOYENS DE PREVENTION DE LA PROLIFERATION DES MICROORGANISMES

L'application de la procédure de désinfection bien qu'au circuit interne ou à ses composants externes et même aux surfaces du générateur doit être en conformité avec les exigences fournies par le fabricant(17).

6.1 LA DESINFECTION INTERNE DU CIRCUIT

6.1.1 La désinfection chimique

La désinfection chimique du circuit hydraulique d'hémodialyse utilise diverses molécules comme de l'acide peracétique associée au peroxyde d'hydrogène et à l'acide acétique dans des proportions différentes(10). L'utilisation d'hypochlorite de sodium permet de prévenir l'activité virucide du chlore actif. En ce qui concerne les concentrations et la fréquence employées, elles dépendent de la conception de la machine donc du fabricant.

6.1.2 La désinfection thermique

Ce type de traitement est utilisé pour les machines qui ne nécessitent ni la désinfection chimique, ni la désinfection thermo-chimique. La méthode consiste à faire circuler l'eau pour hémodialyse à une température dépassant les 85°C mais également la stérilisation à l'autoclave avec une pression de 1,5bar.

6.1.3 La désinfection thermo-chimique

Le traitement thermo-chimique consiste en une élévation de la température en présence d'un produit chimique. Habituellement on associe de :

- L'acide citrique et une température au-dessus de 80°C
- L'acide hydroxyacétique et une température de 85°C

6.2 LA DESINFECTION DES COMPOSANTS EXTERNES DU CIRCUIT ET LES SURFACES DU GENERATEUR

Après chaque séance de dialyse, il est conseillé de réaliser une désinfection des matériaux du générateur ou la surface du lit à l'aide d'un détergent désinfectant adapté. Il est encore plus nécessaire de faire une désinfection à but virucide lorsqu'il y a des traces de sang provenant d'un incident. On cible également les tubes de prélèvement, les pipettes d'aspiration, les raccords dialysat-dialyseur en le désinfectant systématiquement. Néanmoins, ces accessoires doivent être renouveler après un temps d'utilisation.

6.3 LE TRAITEMENT DU TUYAU RELIANT LA BOUCLE DE DISTRIBUTION AU GENERATEUR DE DIALYSE

La désinfection du tuyau reliant la boucle de distribution au générateur de circuit peut être réalisée de façon automatique ou manuelle selon la conception de l'installation. Il vise principalement à l'obtention d'une eau de qualité microbiologique à l'arrivée dans le générateur mais aussi à la prévention du biofilm. Ainsi un lavage des mains avant et après un montage du tuyau limiterait grandement une contamination. Les extrémités du tuyau et ses bouchons doivent être protégées et changer en cas de formation du biofilm.

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

1 MATERIEL

L'évaluation de la qualité de l'eau de dialyse est définie par des critères de qualité sur les plans physico-chimiques, microbiologique et endotoxinique. Ils sont habituellement contrôlés au départ et au retour de boucle. Nous ne présentons ici que la qualité microbiologique et des endotoxines.

1.1 PHASE PRE-ANALYTIQUE

Le recueil des prélèvements a été fait dans le secteur de traitement de l'eau de dialyse. Les échantillons d'eau ont concerné :

- l'eau brute EB
- l'eau avant osmose Av.Os
- l'eau après osmose Ap.Os
- l'eau de la boucle retour BR

Puis dans la salle d'hémodialyse pour prendre le **dialysat** (dial).

Les échantillons doivent toujours être prélevés avec toutes les conditions d'asepsie nécessaires dans des contenants stériles de verre à large ouverture, de capacité d'environ 250 ml, en laissant un espace d'air d'au moins 2,5 cm.

1.2 PHASE ANALYTIQUE

1.2.1 Les appareils

- **Dispositif de filtration sur membrane** : Il est constitué d'un godet (réservoir qui reçoit l'eau), un support de filtre et un bouchon. C'est un appareil qui permet de faire une séparation physique des espèces dissoutes dans le solvant à travers la membrane dont les pores ont un diamètre de 0,45 μm .



Figure 5 : Dispositif de filtration sur membrane(19)

- **Lecteur de microplaques BioTek** : c'est un instrument qui sert à analyser les échantillons contenus dans les puits (96puits). Grâce à l'absorbance, il permet de mesurer la DO ; la gamme étalon est lue sur un ordinateur.



Figure 6 : Lecteur de microplaque(20)

1.2.2 Les réactifs

- **Chromo-LAL** : c'est un extrait aqueux d'améboocytes de *Limule colyophilis* avec un substrat chromogène et tamponné avec un pH neutre. On le reconstitue avec 3,2ml d'eau de réactif de LAL avant son utilisation et le conserve à -20°C dans le congélateur après son utilisation afin d'éviter toute dégradation.
- **Eau de réactif LAL (LRW)** : le LRW est une eau obtenue par distillation ou osmose inverse. C'est une eau stérile qui ne contient pas d'endotoxines car elle a été testée avec le chromo-LAL
- **Endotoxine Standard de Contrôle(CSE)** : obtenue à partir d'une souche d'*E.Coli*, elle sert à préparer les contrôles du dosage et des courbes d'étalonnage.

A cela s'ajoute des accessoires qui viennent avec ces réactifs comme les tubes en verre apyrogènes, les microplaques et les gants. Car ces derniers doivent d'être exempts d'endotoxines donc sont spécialement conçus pour ce test.

2 DENOMBREMENT DES BACTERIES

Ce dénombrement peut servir à vérifier l'efficacité du traitement de l'eau ou indiquer une recroissance bactérienne dans le biofilm. L'analyse microbiologique se fait par la méthode de filtration sur membrane. Elle consiste à recueillir, dénombrer et éventuellement identifier, à la surface d'une membrane filtrante stérile, les bactéries recherchées dans un échantillon.

➤ Mode opératoire

- Tout d'abord on stérilise les entonnoirs et les supports par flambage à l'alcool ;
 - On dépose un filtre de nitrocellulose sur la membrane ;
 - On prélève 100ml (deux fois pour chaque échantillon) de nos différents échantillons (EB, Av.Os, Ap.Os, BR, dial) ;
 - Puis on fait le vide en lançant la filtration ;
- Une fois terminée, on récupère la membrane de nitrocellulose on la dépose sur un milieu TSA puis on incube dans l'étuve pendant 48h à 37°C.

3 QUANTIFICATION DES ENDOTOXINES : Test de LAL

➤ Mode opératoire

- On reconstitue le LAL avec 3,2ml en portant des gants stériles et on le conserve dans l'obscurité ;
- On met l'eau de réactif de LAL dans six tubes (1900 µl dans le premier, 1ml dans le dernier et 900 µl dans les autres) ;
- On prépare la solution mère dans le premier tube à l'aide d'endotoxine standard de contrôle (CSE) de concentration 50UE puis on vortex pendant 1min. On effectue des dilutions successives de 1/10 sauf le dernier tube qui est considéré comme le témoin négatif (vortex pendant 1min après chaque dilution) ;
- On transfère ensuite 3×100 µl de chaque tube dans les trois premiers puits de microplaque ; de façon horizontale et en commençant par le témoin négatif puis la concentration la plus basse (0,005UE/ml) pour remonter à la plus haute (5UE/ml). La solution mère n'en faisant pas partie ;
- A côté, on met 2×100 µl de nos échantillons d'eau en commençant par l'EB et finir avec le dial ;
- On ajoute rapidement notre LAL reconstitué dans les différents puits remplis préalablement puis on dépose la plaque dans le lecteur de microplaque.

4 TESTS D'IDENTIFICATION DES BACTERIES

➤ Mode opératoire

- ✓ COLORATION GRAM : c'est une technique qui permet de déterminer le type de la paroi bactérienne. Elle consiste à utiliser trois colorants et un décolorant (alcool). Successivement on met le cristal violet (1min), le lugol (1min), l'alcool (5s) et la fushine (30s minimum) après qu'on est étalé une colonie bactérienne sur une lame et séchée sur bec de bunsen. La lame est ensuite visualisée au microscope.
- ✓ TEST DE CATALASE : c'est une méthode qui permet de déterminer l'activité aérobie des bactéries à gram+. On utilise du peroxyde d'hydrogène dans lequel on met une petite quantité de bactérie ; s'il y a effervescence, la réaction est dite positive.

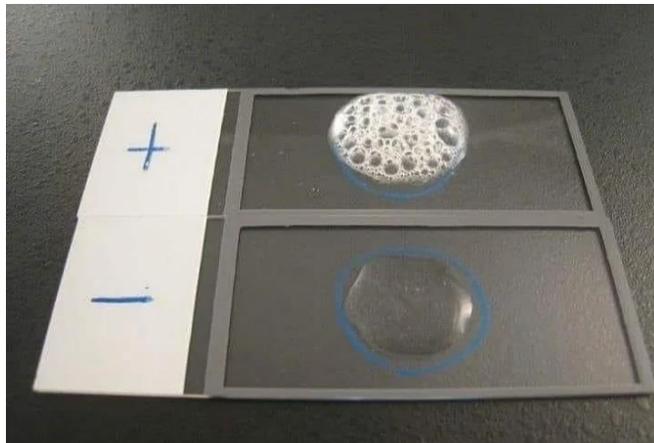


Figure 7 : Test de catalase(21)

- ✓ TEST D'OXYDASE : il détermine l'activité fermentative pour les bactéries à gram-. On frotte une colonie de bactérie sur un « papier à oxydase » et on observe pendant 30s ; s'il y a une coloration violette, le test est positif.

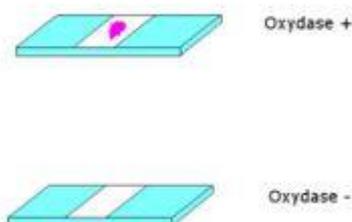


Figure 8 : Test d'oxydase(22)

- ✓ TEST DE COAGULASE : il met en évidence le *Staphylococcus aureus*. Le principe consiste à mettre dans un tube le milieu BHI, y ajouter quelques colonies bactériennes puis du plasma de

lapin reconstitué. On porte la composition à l'incubation pendant 4H ; le résultat est positif s'il y a formation d'un caillot.

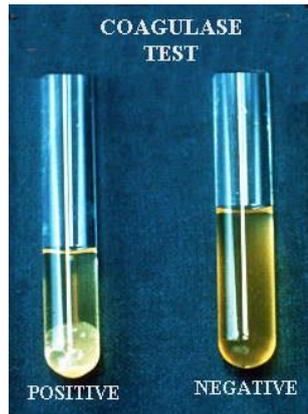


Figure 9 : Test de coagulase(23)

- ✓ GALERIE API : elle permet d'identifier de manière spécifique une espèce. La galerie est composée des tubules dont chacun correspond à un test biochimique ; on remplit ces petits tubes par les échantillons de bactéries, on incube pendant 24H, on fait la lecture puis on entre nos données dans un logiciel qui nous révèle l'espèce.



Figure 10 : Exemple de la galerie API 20E(24)

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

1 RESULTATS

➤ RESULTATS DES ANALYSES BACTERIOLOGIQUE ET ENDOTOXINIQUE

La comparaison entre les valeurs des bactéries trouvées aux limites d'acceptabilité a montré qu'elles sont conformes aux normes dans tous les échantillons sauf dans l'échantillon avant osmose où on constate une augmentation au-dessus du seuil recommandé (123,5 UFC/ml >100UFC/ml).Tab.3

Tableau 3 : Résultat du comptage bactérien

Prélèvement (volume filtré)	Critères d'interprétation en UFC/ml (37°C)	Résultats
EB	<100	13,36 UFC/ml
Av Os (100ml)	<100	123,5 UFC/ml
Ap Os (100ml)	<100	16 UFC/ml
BR (100ml)	<100	0,01UFC/ml
Dial (100ml)	<100	0,22UFC/ml

Le dosage des endotoxines dans tous les échantillons a montré qu'il variait entre 0,36UE/ml et 1,68UE/ml. Ces valeurs dépassent de loin la limite supérieure stipulée par la réglementation, soit supérieures à 0,25UE/ml.Tab.4

Tableau 4 : Résultat de la quantification des endotoxines

Prélèvement (volume filtré)	Critères d'interprétation en UE/ml (37°C)	Résultats
EB	<0,25	1,29 UE/ml
Av Os (100ml)	<0,25	1,68 UE/ml
Ap Os (100ml)	<0,25	0,93 UE/ml
BR (100ml)	<0,25	0,64UE/ml
Dial (100ml)	<0,25	0,36 UE/ml

➤ RESULTATS DES DIFFERENTS TESTS D'IDENTIFICATION

Les différentes techniques d'identification des bactéries nous ont permis d'identifier quelques souches dont :

- *Pseudomonas aeruginosa* grâce au milieu citrimide ;
- *Bacillus Cereus* par le test oxydase et catalase qui étaient positifs ;
- *Staphylococcus aureus* avec un test positif au coagulase ;
- *Staphylococcus sp* au test de coagulase négatif.

2 DISCUSSION

Les personnes atteintes d'insuffisance rénale chronique et traitées par hémodialyse ont une amélioration de vie grâce à la pureté chimique et microbiologique des solutés de dialyse. Par conséquent, quel que soit le dispositif de traitement utilisé, l'eau purifiée doit être en conformité aux normes d'eau de dialyse.

Le premier volet de notre étude a consisté à faire un dénombrement bactérien de l'eau utilisée en hémodialyse au CHU Hassan II de Fès. Nous avons enregistré des valeurs acceptables dans tous les échantillons excepté l'eau avant osmose où le seuil est dépassé. Ceci pourrait s'expliquer par une contamination d'eau à la sortie de l'adoucisseur. Un contrôle en amont et en aval de l'adoucisseur est indispensable pour déterminer exactement l'origine de cette non-conformité.

Le deuxième volet de notre étude a été de doser les endotoxines dans ces mêmes échantillons où nous avons fait le dénombrement bactérien. Le présent résultat a révélé les taux d'endotoxines significativement élevés par rapport à la normale dans tous les échantillons. Nous pouvons en conclure que les endotoxines résultent de la lyse bactérienne donc persistent même en absence de celle-ci. De surcroît, lorsque l'hydrolyse de ces endotoxines pour modifier leur antigène est mal faite, elle favorise plutôt la fragmentation de leur taille qui permet leur passage par certains filtres dont ne peuvent les bactéries.

Le dernier volet de cette étude consistait à identifier les bactéries trouvées dans les liquides de dialyse. Nous avons noté plusieurs fois la présence de *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus sp* et *Bacillus cereus*. Ces résultats pourraient s'expliquer par un manque de désinfection adéquate.

A la lumière de ces résultats, nous avons constaté que les concentrations élevées en endotoxines relevaient de leur nature à traverser certains filtres dont ne peuvent les bactéries. La présence des bactéries trouvées et surtout de *Pseudomonas aeruginosa* serait la conséquence des facteurs

de système de production et d'une absence de désinfection appropriée. Les actions correctives doivent viser une désinfection supplémentaire, et un renouvellement des machines si celles-ci sont usées.

CONCLUSION GENERALE

En hémodialyse, d'énormes quantités d'eau sont utilisées pour diluer les concentrés afin de produire le liquide de dialyse.

La nécessité de cette production d'eau en hémodialyse reste sa qualité en conformité avec les standards microbiologiques et physicochimiques. Le risque infectieux par des microorganismes et des endotoxines doit être maîtrisé par les moyens de désinfection adéquate, de contrôle et de maintenance. C'est en respectant ces recommandations qu'il y aura une biocompatibilité avec les hémodialysés.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Martin PY. Insuffisance rénale chronique. :4.
2. Aoufi A, Rabih SA, Benbrahim OF, Alexandru S, Quirós R. Rebeca García Agudo Ana María España Mendoza. :16.
3. Nystrand R. Microbiology of Water and Fluids for Hemodialysis. J Chin Med Assoc. mai 2008;71(5):223- 9.
4. Ducki S, Francini N, Blech MF. Circuit de traitement d'eau pour hémodialyse : mais où se cache le Bacille pyocyanique ? Néphrologie Thérapeutique. mai 2005;1(2):126- 30.
5. TOOOOUT PFE.pdf.
6. Dorez D, Soule H. L'eau de dialyse en réanimation. Réanimation. juill 2009;18(5):407- 12.
7. 808-02.pdf.
8. Kunegel E. L'eau et les liquides de dialyse dans le traitement de l'insuffisance rénale chronique terminale. :175.
9. Coulliette AD, Arduino MJ. Hemodialysis and Water Quality. Semin Dial. juill 2013;26(4):427- 38.
10. 390-revue-38-page-39-40-41-42.pdf.
11. Allard B. Aquavigilance : approche générale et maîtrise des risques de production d'eau. :8.
12. Baghdouche A. TRAITEMENT DE L'EAU EN HEMODIALYSE. :81.
13. Holden B, Greetham M, Croll BT, Scutt J. The effect of changing inter process and final disinfection reagents on corrosion and biofilm growth in distribution pipes. :8.
14. Rasamiravaka T, Labtani Q, Duez P, El Jaziri M. The Formation of Biofilms by *Pseudomonas aeruginosa* : A Review of the Natural and Synthetic Compounds Interfering with Control Mechanisms. BioMed Res Int. 2015;2015:1- 17.
15. Biofilms_couv.jpg.
16. PROBLEMATIQUE_DES_ENDOTOXINES_EN_DIALYSE_DANS_LE_M.pdf.
17. Greff-Mirguet G. Echantillonnage et analyse des endotoxines dans l'air. Etude bibliographique. 2002;17.
18. SF2H_bonnes-pratiques-hygiene-en-hemodialyse-2005.pdf.

WEBOGRAPHIE

16. https://www.researchgate.net/profile/Severine_Jacquet/publication/265430529_PROBLEMATIQUE_DES_ENDOTOXINES_EN_DIALYSE_DANS_LE_MILIEU_MEDICAL/links/56b9ed1908ae9d9ac67f3d18.pdf?origin=publication_detail
17. <https://docplayer.fr/117348193-L-eau-en-hemodialyse-les-contaminations-du-dialysat-aquadiavigilance-pharmacien-echo-1-benedicte-allard.html>
18. https://www.encyclopedie-environnement.org/app/uploads/2020/03/Biofilms_couv.jpg
19. <http://www.sante.gov.ma/Reglementation/PRATIQUEDESMETIERSDESANTEDANSLESECTEURPRIVE/808-02.pdf>
20. https://www.acciusa.com/pdfs/accProduct/Chromo-LAL_multilang_IFUs/S_CHROM_LBL_0666_PN001087r5_FR.pdf
21. <https://microbiologie-clinique.com/catalase-test.html>
22. <https://fr-academic.com/dic.nsf/frwiki/1416597>
23. <https://microbeonline.com/diagnostic-tests-biochemical-tests-coagulase-test/>
24. <https://biotechnologies.enseigne.ac-lyon.fr/spip/spip.php?article58>

ANNEXE

TECHNIQUES APPRISES AU LABORATOIRE

- ✓ Préparation du milieu de culture : le milieu de culture permet d'isoler les bactéries en vue de leur croissance pour pouvoir les identifier. Pour le préparer, il est recommandé de lire les consignes sur l'étiquette pour s'assurer de peser la quantité qu'il faut pour le volume voulu. Après avoir pris le soin de bien peser, on met dans un flacon la moitié de l'eau distillée mesurée préalablement, on y ajoute le milieu de culture puis on agite ; on verse ensuite l'eau restante et on le porte sur un agitateur. Une fois bien dissout et homogène, on le met dans l'autoclave pour le stériliser. A noter que la stérilisation est effectuée à 121°C.

La stérilisation terminée, on laisse refroidir le milieu de culture puis on le coule dans les géloses à pétri.

- ✓ TECHNIQUE D'ENCEMENCEMENT :
 - **Ensemencement par épuisement** : le principe consiste à diviser le milieu de culture en quatre quadrants et y étaler successivement les microorganismes afin d'obtenir des colonies bien distinguées.
 - **Ensemencement par piqure sur un milieu en culot et sur la pente** : à l'aide de l'anse, on prélève une colonie puis on fait une piqure centrale dans le culot. En ce qui concerne la pente, on fait des stries serrées
 - **Ensemencement en profondeur** : on dépose tout d'abord nos colonies mélangées à l'eau distillée dans la boîte à pétri puis on coule dessus le milieu de culture ; on mélange délicatement.
 - **Ensemencement par étalement** : technique qui sert à faire le dénombrement bactérien ; on pipe un volume connu, on dépose sur notre milieu de culture et on l'étale avec un râteau.
 - **Ensemencement sur un milieu liquide** : c'est une technique qui consiste à déposer sur un milieu liquide soit une colonie et à rendre homogène la composition ou soit déposer un produit liquide à l'aide d'une pipette.
- ✓ TECHNIQUE DE PCR : la technique de PCR réalisée durant mon stage avait pour but de déterminer les gènes de résistance de KP. Les souches de KP étaient prélevées chez les nouveaux nés où on a ensemencé puis extrait leurs ADN.

On a préparé ensuite le mix avec le lequel on a mis les ADN extraits et des amorces ; on a lancé la PCR avec un thermocycleur pendant 2H en s'assurant de bien vérifier les consignes en ce qui concerne le volume, les températures d'hybridation des amorces choisis.

La lecture a été faite sur un gel d'agarose branché à un générateur

LES DIFFERENTS MILIEUX DE CULTURE PREPARES

- ✓ MILIEU TSA : c'est un milieu qui contient tous les nutriments et est utilisé en général pour la culture de bactéries non exigeantes mais aussi pour l'isolement.
- ✓ MILIEU DE CITRATE DE SIMMONS : il est utilisé comme source de carbone chez les bactéries gram- pour différencier E.Coli des autres espèces.
E.Coli donne une réaction négative (coloration verte) et les autres poussent sur ce milieu (coloration bleue).
- ✓ MILIEU EMB : c'est un milieu à la fois sélectif et différentiel pour les bacilles gram-.
- ✓ MILIEU CLED : c'est un milieu utilisé surtout dans la détection des microorganismes qui causent des pathogènes urinaires.
- ✓ MILIEU BAIR-PARKER : c'est un milieu différentiel pour les staphylococcus aureus.
- ✓ MILIEU CHAPMAN : c'est un milieu sélectif pour les staphylococcus.
- ✓ MILIEU KLIGER : il permet de voir la fermentation des sucres (glucose et lactose).
- ✓ MILIEU CITRIMIDE : c'est un milieu sélectif pour Pseudomonas aeruginosa.
- ✓ MILIEU MR-VP : c'est un milieu utilisé pour identifier les Entérobactéries.
- ✓ MILIEU BHI : c'est un milieu non-sélectif utilisé pour réaliser le test de coagulase notamment pour les Staphylococcus aureus.
- ✓ MILIEU ROUGE CONGO : il permet d'identifier les bactéries productrices de biofilm.