

Diplôme d'Etat de Préparateur hospitalier

UE Contrôles

Contrôle microbiologique

Vincent Lisowski

Pharmacien Laboratoire de contrôle - Pôle Pharmacie CHU Montpellier
PU-PH - UFR Pharmacie Montpellier

Mars 2025



I. Les contrôles microbiologiques environnementaux



- Le risque infectieux à l'hôpital
- Les contrôles microbiologiques environnementaux
 1. Généralités
 2. Contrôles microbiologiques de surfaces
 3. Contrôles microbiologiques d'eau
 4. Contrôles microbiologiques d'air
 5. Risques liés aux travaux

Le risque infectieux à l'hôpital

- **Risque d'acquisition ou de transmission des maladies infectieuses (bactériennes, virales, fongiques ou ATNC)**
- Il est fonction :
 - des portes d'entrée : voies de contamination
 - des modes de transmission
 - de la virulence de l'agent infectieux
 - des défenses de l'hôte
- A prévenir par des mesures de prévention, de précaution, de protection

- **A l'hôpital**, il concerne les patients, les personnels, les visiteurs

Mais aussi en dehors de l'hôpital du fait de relations étroites avec la communauté tout au long du parcours de soins des patients

Concepts de base et définitions :

L'Hygiène Hospitalière



- L'hygiène hospitalière n'est pas que l'hygiène domestique
- Mais un ensemble de démarches de prévention, de protection, de précaution : pour maîtriser les Infections Associées au Soins, **« Infection control »**
- Ses missions : maîtriser le risque infectieux à l'hôpital, coordonner, mettre en œuvre, évaluer les actions de prévention des infections associées aux soins pour en diminuer l'incidence
- Objectifs :
 - Prendre conscience que l'hôpital est un **lieu à risque**
 - Connaître les facteurs de survenue d'une infection
 - Se situer comme **acteur** dans la démarche d'hygiène
 - Connaître les moyens de prévention, les outils et les personnes ressources

Les missions du Département d'Hygiène Hospitalière

Laboratoire d'HH : LEMH

Garantir la **sécurité**
de l'environnement de soins
- contrôles microbiologiques de
l'environnement des services à
risque

Unité d'HH – veille infectieuse

Garantir la **sécurité** des soins
- prévention des infections
associées aux soins
- veille, alerte, signalement,
surveillance, formation

Démarches Qualité

Alertes, investigations épidémiques

Travaux

Encadrement des unités ou des activités à risque spécifique

1. Généralités : les contrôles microbiologiques d'environnement (1)

Objectifs

- **Contrôles dans le cadre d'une procédure de qualification d'une installation** : avant le démarrage des activités dans un nouvel environnement (ex: salles opératoires dans un bloc)
- **Contrôles à visée de surveillance** :
 - Plan de maintenance d'une installation (ex : flux laminaire)
 - Plan d'action qualité : surveillance de points critiques dans une zone à risque
 - Travaux générant un risque (risque aspergillaire, légionelle..)
- **Contrôles à visée d'investigation** : enquête épidémiologique à la recherche d'une source de contamination environnementale
- **Contrôles à visée pédagogique** : vérification de la qualité de l'entretien de l'environnement

2. Généralités : les contrôles microbiologiques d'environnement (2)

Laboratoire d'Hygiène Hospitalière
(LEMH)

Contrôles microbiologiques
Surfaces, eau, air

Mais aussi lait, endoscopes,
Aliments...

Indicateurs qui s'intègrent dans un plan qualité
visant à la gestion du risque infectieux



2. Contrôles microbiologiques de surfaces (2)

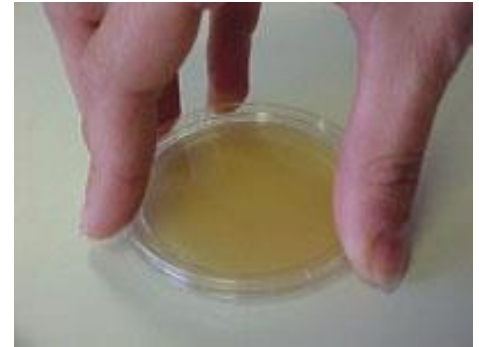
- **Lieux et points de prélèvements :**

- Cartographie des points à surveiller prioritairement pré-établie
= risque infectieux le + élevé pour les patients
- pour un suivi comparatif, conserver les mêmes points de prélèvements, selon la même méthodologie
- Exemples :
 - Salle d'opération/salle de radiologie interventionnelle : au moins 10 points choisis dans la zone opératoire (table d'opération, table d'instrumentation...)
 - Chambre d'isolement protecteur avec flux laminaire : 5 à 10 points sous le flux et hors flux
 - Hotte à flux laminaire : 3 points minimums
 - Service de stérilisation (zone de conditionnement) : non fixé

2. Contrôles microbiologiques de surfaces (4)

- **Méthodologie** : méthode standardisée +++

- Surfaces planes : **Gélose contact**®
pression de 500 g (+/- 50g) pendant 10 sec
sur une surface de 25 cm² : détection des bactéries
globalement et la présence des cocci G+



- Surfaces non planes ou difficilement accessibles :
écouvillonnage sec ou humide (écouvillon stérile)
- Pour la recherche des champignons les 2
méthodes sont équivalentes



2. Contrôles microbiologiques de surfaces (5)

- **Critères d'interprétation :**
 - Salle d'opération/salle de radiologie interventionnelle ,
chambre d'isolement protecteur avec flux laminaire, hotte à
flux laminaire :
 - **Germes totaux : cible ≤ 5 et absence de germes
pathogènes**
 - ***Aspergillus* ou autre champignons filamenteux : cible ≤ 1**
 - Service de stérilisation (zone de conditionnement) : non fixé

2. Contrôles microbiologiques de surfaces (6)

- Au CHU de Montpellier :
 - Contrôles des surfaces des services à risque : blocs opératoires, zone de conditionnement stérilisation, hémato-oncologie, réanimations.... : réalisés et analysés par le LHH
 - Contrôles des surfaces des zones de production de médicaments stériles, pôle pharmacie : Sorbonnes des radiopharmacies, isolateurs/hotte à flux laminaire salle de mise en forme aseptique pharmacie Lapeyronie, autocontrôles préparatoires... : réalisés par les manipulateurs et analysés au LCP (Laboratoire de Contrôles Pharmaceutiques)

3. Contrôles microbiologiques d'eau (1)

Chaque catégorie d'eau est définie par des exigences de qualité et des modalités de surveillance

- Paramètres microbiologiques et physico-chimiques
- Limites de qualité (niveaux cible, d'alerte et d'action)
- Lieux de prélèvement et fréquence des contrôles
- Technique de prélèvement

Eaux en contact avec

Le patient



Le personnel soignant



Les dispositifs médicaux



3. Contrôles microbiologiques d'eau (2)

Typologie des eaux au sein d'un hôpital

1. Eaux à usage alimentaire
2. Eaux à usage de soins
 - Eau pour soins standards
 - Eau bactériologiquement maîtrisée
 - Eau chaude sanitaire
 - Eau des piscines de rééducation
 - Eaux des bains à remous et douches à jets
3. Eaux codifiées par la Pharmacopée
 - Eau pour hémodialyse
 - Eaux purifiées et hautement purifiées
 - Eaux stériles
4. Eaux techniques



3. Contrôles microbiologiques d'eau (3)

Legionella pneumophila

- Bacille Gram –
 - Environ 50 espèces (> 70 sérogroupes) :
Legionella pneumophila : 15 sérogroupes
 - 20 espèces ont été isolées chez l'homme : *L.pneumophila* est responsable de 97% des infections humaines et 80% des cas sont dus à *L.pneumophila* séro groupe 1
-
- Prolifération favorisée par : stagnation de l'eau, T° C comprise entre 25 et 45° C, présence d'amibes, nutriments (Fer, Zinc), corrosion, tartre, travaux dans les réseaux, présence de biofilms...



3. Contrôles microbiologiques d'eau (4)

Legionella pneumophila

A l'hôpital

- Eau chaude sanitaire : douches (brumisation)
- Climatisation
- Cumulus, bains à remous, thermalisme, jets
- Bacs à condensats dans systèmes de chauffage

Bactérie aquicole et ubiquiste

- Présente dans les eaux douces (lacs, rivières, étangs, canaux d'irrigation, boues humides et vases...)
 - Absente en mer, boues sèches et chez l'animal

3. Contrôles microbiologiques d'eau (4)

- **Porte d'entrée respiratoire : aérosolisation de microgouttelettes (seule voie de contamination)**
- Pathogène opportuniste (patients immunodéprimés) : responsable de pneumopathies graves
- Aucun cas de transmission interhumaine
- Les personnes exposées peuvent contracter :
 - Un syndrome pseudo-grippal : fièvre de Pontiac
 - Des infections non pulmonaires viscérales
 - Maladie « du légionnaire » ou légionellose : infection pulmonaire aigue sévère (mortalité 11%) : Incubation 2 à 10 jours; *L.pneumophila* Sg 1 responsable de plus de 80% des cas; atteinte pulmonaire, troubles psychiques, IR mortelle; MDO auprès des ARS; si légionellose nosocomiale : signalement externe ARS/CCLIN/InVS

3. Contrôles microbiologiques d'eau (9)

Pseudomonas aeruginosa

- Bactérie Gram - pathogène opportuniste pouvant se trouver dans l'eau potable
- Principalement située au sein de **biofilm** (installation durable) et relargué dans l'eau par un mécanisme d'arrachage
- Contamination par aérosol et par contact (contamination buccale par soins de bouches, des mains (lavage des mains)...)
- Contamination des réseaux de canalisation, des points d'eau et des appareillages



Figure 1. *Pseudomonas aeruginosa* Provided by Julia Plotnikov

3. Contrôles microbiologiques d'eau (10)



- **OU ?** Services à risque : blocs opératoires, réanimations, oncologie...
- **QUI ?** Laboratoire d'Hygiène Hospitalière
- **QUAND ?** Contrôle trimestriel pour les blocs et semestriels pour services de soins à risque; travaux; épidémie...

- Flacon 250 ml additionné de thiosulfate (neutralise l'action du chlore)

- 1^{er} jet (sans purge) et 2^{ème} jet (après 2 minutes de purge)

- Pré-analytique : filtration dans les 24h après le prélèvement (conservation à 4° C).
- Filtration sur membrane de nitrate de cellulose de porosité 0.45 µm :
 - 50 ml sur PCA (plate count agar) : dénombrement de la flore totale mésophile
 - 200 ml sur cétrimide : recherche spécifique de *P. aeruginosa*

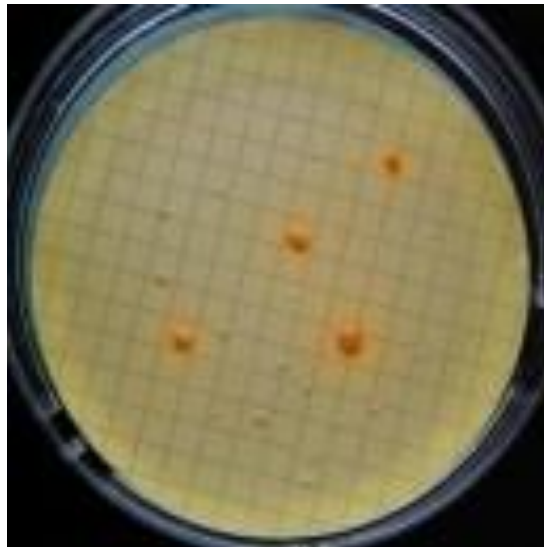
3. Contrôles microbiologiques d'eau (11)



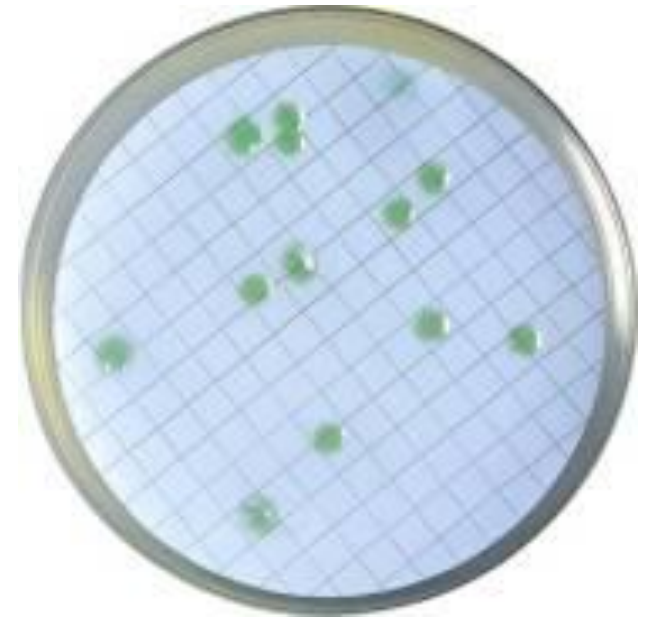
- **Etape de filtration** de l'eau prélevée à l'aide d'une rampe de filtration sous PSM

Résultats de la culture

Exemples :



Flore totale sur membrane 0.45 µm
mise en culture sur gélose PCA



P. aeruginosa sur membrane 0.45 µm
mise en culture sur gélose cétrimide

3. Contrôles microbiologiques d'eau (12)

Moyens d'action en cas de résultats
non conformes

- **Mesures impliquant les services de soins = respect des procédures**
 - Purges
 - Entretien du point d'eau : décontamination siphons, essuyage au DD de la surface des filtres, détartrage des brise jets
 - **Mesures impliquant les services techniques**
 - Démontage, détartrage et désinfection des robinets
 - Remplacement des siphons
 - Surchloration de l'eau des réseaux bouclés
 - Régulation de la température
 - Suppression de bras morts et points d'eau inutiles
- + Contrôle d'efficacité des mesures**

3. Contrôles microbiologiques d'eau (13)

Contrôle d'efficacité des mesures



Conforme

Non conforme

Reprise des
contrôles
périodiques

Echec des mesures de remédiation
**Pose d'une barrière entre la
contamination et le patient
= FILTRE**



Echec des mesures
correctives
Pose *a priori* dans les
services à hauts risques
(ex :onco-hématologie)
- Situations
épidémiques: 2005-
2010, résolution de 5
crises épidémiques par
la pose de filtres

4. Contrôles microbiologiques d'air (1)



- **Risques liés à l'air :**
- Vétusté de certains locaux
 - Fenêtres non étanches, l'air passe parfois pendant les périodes de grand vent
- Renouvellement d'air insuffisant
 - Des locaux sans fenêtre
 - Gaines non nettoyées
- Décartonnage
 - Certaines armoires de livraison passent par l'extérieur
 - Présence d'*Aspergillus* dans les cartons ondulés = **danger en secteurs protégés**

4. Contrôles microbiologiques d'air (2)

Rôle de l'air

- Poussières ou particules inertes = supports aux micro-organismes
- Taille de ces particules importante pour expliquer les modalités de transmission de la contamination :
 - **> 5 μ m : «courts-courriers»** de la transmission aérienne car sédimentent rapidement et diffusent sur une faible distance

Ex : squames et phanères 5-30 μ m, particules textiles 10-100 μ m, goutellettes de flügge (5-100 μ m)

- **< 5 μ m : «longs-courriers»** : restent en suspension pendant plusieurs heures et diffusent plus largement

Ex: une particule d' 1 μ m sédimente d' 1 mètre en 8 h

 Plus il y a de particules inertes dans l' air, plus il y a de vecteurs pour les micro-organismes

MAIS il n' existe cependant pas de relation linéaire entre le niveau d' empoussièrement et l' aérobiocontamination

4. Contrôles microbiologiques d'air (3)

Principaux micro-organismes dans l'air

◆ Sur les poussières ou particules sèches et inertes:

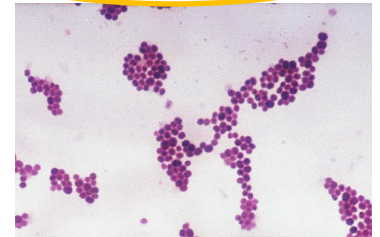
***Bacillus* sp., *Micrococcus* sp.**

Peu ou non pathogènes. Très ubiquitaires.

***Bacillus* sp. est une bactérie sporulante = résistante**

= excès de poussière

BACTERIES



◆ Dans les aérosols hydriques : ***Pseudomonas aeruginosa*, *Legionella pneumophila***

Pathogènes +++

= eau contaminée

◆ Dans les aérosols et particules d'origine humaine (toux, postillons, squames, cheveux,,):

- **Staphylocoques à coagulase négative, *Staphylococcus aureus***

- ***Streptococcus* sp, bactéries ORL et bucco-dentaires**

= présence humaine excessive = au delà des capacités de traitement d'air

4. Contrôles microbiologiques d'air (4)

Principaux micro-organismes dans l'air

CHAMPIGNONS

Champignons filamenteux type « moisissures »

Forment des spores très résistantes et très diffusibles

✓ Pathogènes pour les patients immunodéprimés :

- *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*,

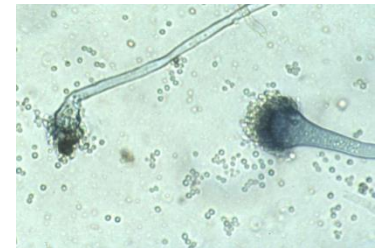
Aspergillus flavus...

- *Mucor* sp.

✓ Non pathogènes:

- *Penicillium* sp, *Cladosporium* sp, *Alternaria* sp etc...

- CFUS= champignons filamenteux ubiquitaires saprophytes



Attention aux travaux!!!

4. Contrôles microbiologiques d'air (8)

• Indications ?

- Contrôles périodiques de l' environnement : salles d' opération contrôlées 1 fois/ an minimum
- Après travaux d' une zone à l' intérieur du bloc où d' une zone extérieure pouvant impacter la qualité de l' air du bloc opératoire
- Suite à une panne de CTA
- Suite à une épidémie (ISO)

• Qui?

- Personnel spécifiquement formé (**Laboratoire d'Hygiène Hospitalière**)
- Tenue de bloc
- Désinfection des mains par friction avec une solution hydro-alcoolique (SHA) avant d' entrer en salle d' opération

• Où ?

- Blocs opératoires : Salle d' opération, annexes (Pré-anesthésie, réserve stérile, salle de réveil...)
- Services à risques : hémato-onco, soins intensifs, zone de conditionnement stérilisation, salles blanches (labos, unité préparation des chimiothérapies)...

4. Contrôles microbiologiques d'air (9)

- **Quand?**

- Hors présence humaine, hors activité, en présence de mobilier
- Au moins 1h après le bionettoyage, de préférence tôt le matin (nettoyage fait la veille)
- Système de traitement d'air en marche depuis au moins 2 heures

- **Comment ? Par méthode d'impaction**

Le biocollecteur :

- Volume d'air à prélever programmable
- Norme ISO 14698-1 : capacité de prélèvement 1M³, débit 100L/minute, vitesse d'impaction <20 m/sec)
- Désinfection des surfaces externes, stérilisation des surfaces amovibles
- Etalonnage; Possibilité de démarrage à distance

4. Contrôles microbiologiques d'air (10)

- Quel Volume d'air prélever ?

- Salle d'opération : 1000L
- Pré-anesthésie, réserve, salle de réveil : 500L



4. Contrôles microbiologiques d'air (11)

Milieu Sabouraud

pour les champignons

Culture : 25-30° C pendant 7 jours



Milieu TSA (trypticase soja agar)

pour les bactéries

Culture : 30-35° C pendant 3 jours



Salle d'opération :

Flore Fongique :

- Niveau cible : Absence /1 m³
(*Aspergillus* spp ou autre champignon filamenteux)
- Niveau d'Alerte et d'Action : ≥ 1 UFC /1 m³
(*Aspergillus* spp ou autre champignon filamenteux)

Flore bactérienne

<20, <10 ou <5 UFC/m³ selon le flux

4. Contrôles microbiologiques d'air (12)

Prévention du risque infectieux lié à l'AIR

- **Dans les unités de soins :** Nettoyage des bouches de ventilation
- **En bloc, services à risque :** Décartonnage hors du service
- **Les services techniques :**
Maintenance des filtres des centrales de traitement de l'air



tous les 6 mois

- **Le laboratoire d'hygiène hospitalière:**

Surveillance de la qualité de l'air dans les blocs, les secteurs protégés (patients immunodéprimés, greffés..) et après travaux dans les services à risque

4. Contrôles microbiologiques d'air (13)

Dispositifs mobiles de traitement de l'air

«**Plasmair®**» : dans le cas d'une contamination dans une pièce avec patient (chambre par exemple)



- «**Aseptair®**» :
indiqués au CHRU
dans le cas d'une
contamination dans
une pièce sans patient
(ex: plateau technique,
réserve médimath
dans un bloc)



4. Contrôles microbiologiques d'air (14)

Prévention de l'aérobiocontamination

✓ Limiter la dissémination

- Port d' une tenue correcte
- Modalités du port du masque chirurgical, cagoule enveloppant complètement les cheveux, extrémité élastique (évite les effets de soufflet)
- Limite dans le nombre de personnes présentes dans une salle d' intervention
- Discipline dans les comportements : Eviter mouvements amples et inutiles; Limiter l' ouverture des portes (lors des temps opératoire à risque++)

✓ Elimination des particules en suspension

- Traitement d' air efficace (renouvellement de l' air, surpression)
- Qualité de l' air soufflé

✓ Elimination des particules sédimentées : Bionettoyage des surfaces pluriquotidien

5. Risques liés aux travaux (1)

Constructions et risques

Les travaux dans un environnement hospitalier :

- Majorient considérablement le risque de contamination de l'environnement
 - Par l'air
 - Par les surfaces
 - Par l'eau
- Sont à risque pour les personnes hospitalisées, ainsi que pour les visiteurs et les agents

=> Nécessité d'un cadre cohérent et organisé (réalisation des travaux en assurant la continuité des soins)



5. Risques liés aux travaux (2)

Quelles nuisances durant les travaux ?

➤ **L'empoussièrement**

- sur les surfaces, les mobiliers
- sur les textiles, sur le matériel de soins...
- dans l'air, dans l'eau

➤ Les coupures d'eau, d'électricité, de ventilation

➤ Les changements et les allongements de circuits

➤ Le bruit

➤ Les odeurs

➤ Le délogement des animaux...



5. Risques liés aux travaux (3)

Quels risques?



- **Pour le patient (risque aspergillaire élevé) :**
 - Selon les actes réalisés
 - Selon l'état immunitaire :
 - Les 2 extrêmes de la vie
 - Certaines pathologies : leucémie, aplasie, SIDA,...
 - Les traitements lourds : chimiothérapie, corticothérapie, immunosuppresseur
 - Présence de DM invasifs
- **Pour l'intervenant technique :** Il est capable de se défendre du risque aspergillaire mais peut être exposé au risque lié :
 - aux liquides biologiques
 - au contact avec un patient infecté et son environnement

5. Risques liés aux travaux (4)

Isoler la zone de travaux :

Placoplatre, Polyanes, Portes ...



5. Risques liés aux travaux (5)

Vérification possible du confinement

_ selon le niveau de risque et la localisation

_ par réalisation de test fumigène

(laboratoire d'hygiène hospitalière – direction des travaux)



5. Risques liés aux travaux (6)

et ...Après les travaux

Avant la reprise d'activité, pour protéger les patients dans les secteurs à risque, en fonction des travaux, après le nettoyage, le laboratoire d'hygiène hospitalière réalise :

- des prélèvements d'air +/- de surfaces
 - des prélèvements d'eau

II. Les contrôles microbiologiques pharmaceutiques



1. Présentation du Laboratoire de Contrôles Pharmaceutiques (LCP)
2. Contrôles microbiologiques des eaux de dialyse
3. Essais de stérilité
4. Tests de Remplissage Aseptique
5. Contrôles microbiologiques de surfaces
6. Identification microbienne en spectrométrie de masse : Maldi-Tof[®]



1. Présentation du LCP (1)

Laboratoire de contrôles MICROBIOLOGIQUES Hôpital Saint-Eloi

- Eaux de dialyse
- Essais de stérilité
- Tests de remplissage aseptique
- Prélèvements de surfaces
- Etudes de stabilité...

Pôle pharmacie
Service de pharmacotechnie et essais
cliniques

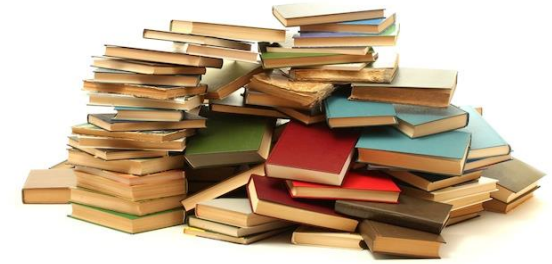


Laboratoire de contrôles PHYSICO- CHIMIQUES Pharmacie Euromédecine

- Eaux de dialyse
- Matières premières
- Préparations
- Etude de stabilité
- Mises au point de méthodes de dosage de PA...

2. Contrôles microbiologiques des eaux de dialyse (1)

Eau de dialyse = Médicament »
Stérile et apyrogène
Responsabilités:
Néphrologue et Pharmacien



Aspect réglementaire :

- **Circulaire DGS/DH/AFSSAPS n° 2000-337 du 20 juin 2000**

Relative à la diffusion d'un guide pour la production d'eau pour l'hémodialyse des patients insuffisants rénaux.



Remplacée par :

- **Circulaire DHOS/E4/AFSSAPS/DGS n° 2007-52 du 30 janvier 2007**

Relative aux spécifications techniques et à la sécurité sanitaire de la pratique de l'hémofiltration et de l'hémodiafiltration en ligne dans les établissements de santé.

- **Pharmacopée européenne 11^{ème} édition** : Monographie « Eau pour dilution des solutions concentrées pour hémodialyse »

2. Contrôles microbiologiques des eaux de dialyse (2)

L' hémodialyse : définition et généralités

- L'hémodialyse = technique d'épuration extra-corporelle du sang à l'aide d'un rein artificiel (dialyseur, formé par une membrane de dialyse)

=> Echange entre le sang du patient et une solution voisine du plasma (dialysat)

- But = suppléance des fonctions d'excrétion et de régulation hydroélectrolytique des reins

Rapport annuel R.E.I.N : au 31.12.2014 : 44419 patients dialysés avec 15.5% de décès (6874)

Patient dialysé = 3 séances de dialyse/semaine

1 séance = 3 ou 4 heures

2. Contrôles microbiologiques des eaux de dialyse (6)

Circuit du traitement de l'eau

- **Prétraitement de l'eau**

- 1^{ère} filtration : élimination des impuretés et particules en suspension. Efficacité de ces filtres maintenue dans le temps grâce au respect des fréquences de changement préconisées par le constructeur
- Adoucissement: abaissement de la dureté de l'eau permet la prévention de l'entratrage des canalisations et des étapes de filtration terminale.

Attention, l'adoucisseur = risque de prolifération bactérienne

- Filtration sur charbon actif: absorption des résidus chlorés et halogénés

Attention, le charbon actif = risque de prolifération bactérienne également

2. Contrôles microbiologiques des eaux de dialyse (7)

Circuit du traitement de l'eau

- **Traitement : double osmose inverse**

- Principe : application d'une très forte pression sur une membrane d'osmose, obligeant le solvant à aller de la solution la plus concentrée vers la solution la moins concentrée
- Permet l'élimination de tous les composants organiques et de 99% des ions résiduels
- Il est donc possible de produire de l'eau pure à partir de l'eau de ville prétraitée.
- Désinfection: chimique, chaleur, automatisée, semi-automatisée



2. Contrôles microbiologiques des eaux de dialyse (12)

1. Eau pour Hémodialyse pouvant être produite :

- par une grosse centrale fixe alimentant elle-même une boucle :
contrôles en départ et retour de boucle

Matériel nécessaire au prélèvement :

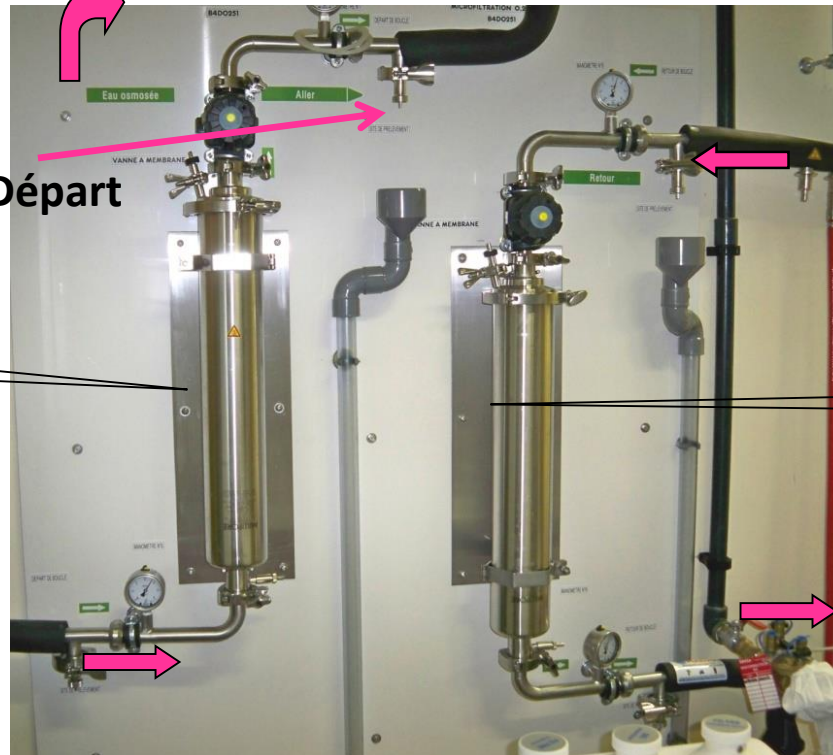
- alcool 70° C : désinfection du site de prélèvement
- Pots stériles de 1L : recueil des eaux des centrales pour contrôle bactériologique (1L départ et 1L retour de boucle)
- Pots à coproculture de 150 ml : recueil des eaux des centrales en départ de boucle uniquement pour contrôle endotoxinique



Filtre 0,22 μ m

Sortie Osmoseurs

Vers générateurs de dialyse
Départ



Centrale de distribution

Retour

Filtre 0,22 μ m

Retour Osmoseurs

2. Contrôles microbiologiques des eaux de dialyse (13)

1. Eau pour Hémodialyse pouvant être produite :

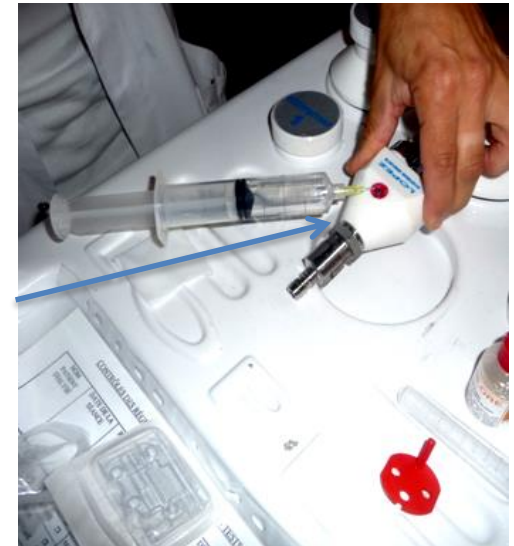
par une mini-centrale mobile alimentant un seul générateur : **contrôles en sortie de mini-centrale**



Matériel nécessaire au prélèvement :

- alcool 70° C : désinfection du site de prélèvement
- seringues stériles de 30 ml, aiguilles de Huber, embout luer stérile : prélèvement en sortie des MCL

Site de prélèvement bactériologique



2. Contrôles microbiologiques des eaux de dialyse (14)

2. Dialysat : solution à partir de laquelle les échanges vont avoir lieu avec le sang du patient à travers la membrane semi-perméable

Le dialysat est fabriqué à partir de l' eau alimentant le générateur de dialyse : cette eau est mélangée aux électrolytes puis filtrée

La solution obtenue est appelé dialysat ultrapur

3. Infusat (HF ou HDF uniquement) est fabriqué à partir d' une filtration du dialysat ultrapur affluent

L' infusat est injecté directement au patient (compensation volémique)

Prélèvements effectués par les services et envoyés au LCP pour analyse
(Guide pratique des prélèvements. Fresenius)

2. Contrôles microbiologiques des eaux de dialyse (15)

Au CHU de Montpellier :

- Contrôles (prélèvements + analyses) de l'eau d'hémodialyse produite par les centrales (CL) et minicentrales (MCL) sont réalisés par le LCP:
 - 1 fois/semaine pour les contrôles bactériologiques
 - 2 fois/mois pour les contrôles endotoxiniques en départ de boucle et 1 fois/mois pour les MCL
 - 1 fois/mois pour les contrôles physico-chimiques
- Prélèvements des infusats/dialysats sont réalisés par les services de soins, analyses bactériologiques/endotoxiniques par LCP : 1 fois/trimestre pour chaque générateur - 1 fois/mois pendant 3 mois en phase de qualification

2. Contrôles microbiologiques des eaux de dialyse (16)

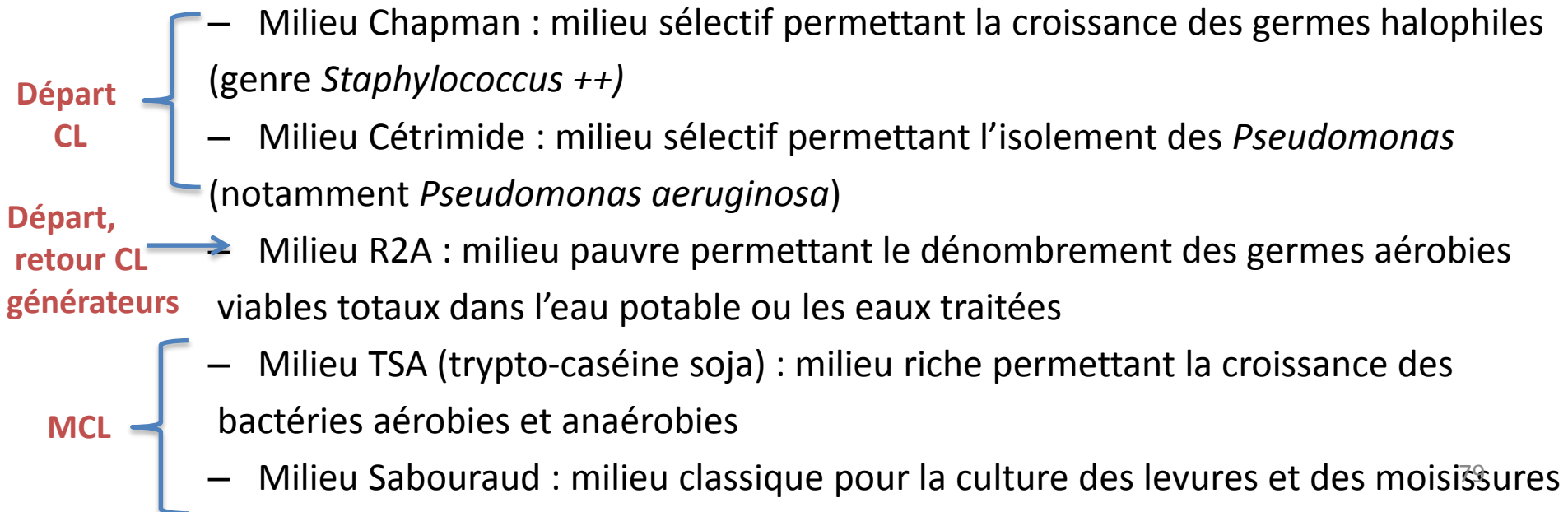
Analyse microbiologique

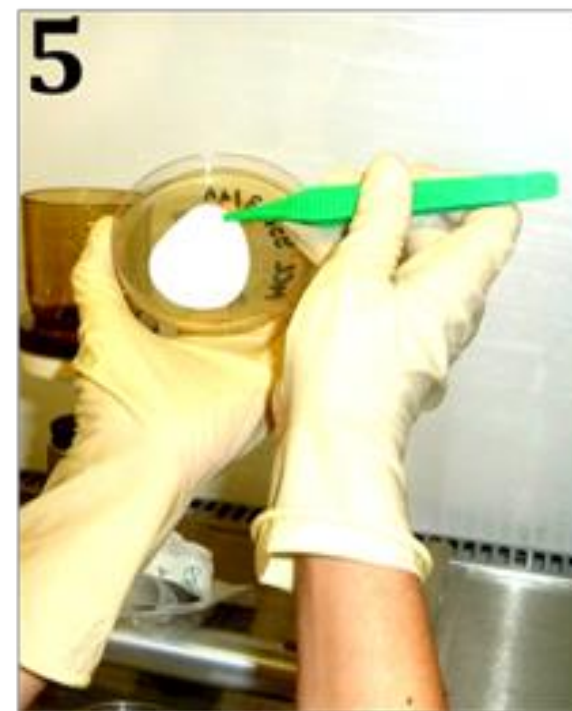
✓ Pré-analytique

Analyse maximum 24h après le prélèvement, conservation à 4° C avant analyse

✓ Analyse

- L'analyse des échantillons doit être effectuée dans un environnement maîtrisé (PSM)
- Pompe à vide et rampe de filtration, membranes d'acétate de cellulose hydrophile 0,45µm, pinces plastiques stériles, entonnoirs de filtration stériles (300ml ou 150 ml) : technique de filtration sur membrane
- Transfert de la membrane sur :



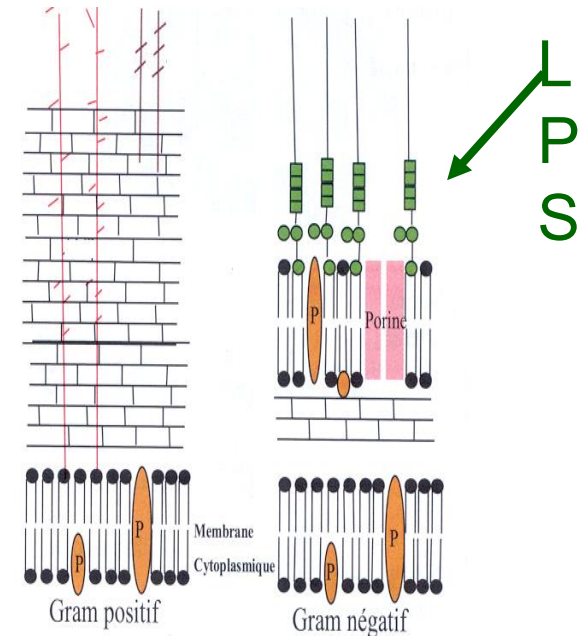


2. Contrôles microbiologiques des eaux de dialyse (21)

Analyse endotoxinique

Rappel sur les endotoxines :

- ✓ substances de nature liposaccharidique contenues dans la membrane externe de toutes les **bactéries à Gram négatif**
- ✓ **partie phospholipidique = le lipide A = endotoxine**
 - toxique ++
 - forte résistance aux agents physico-chimiques
- 1 partie polysaccharidique débordant la membrane externe



2. Contrôles microbiologiques des eaux de dialyse (22)

Pouvoir pathogène

- Libération d'endotoxines (septicémie à BGN) : hyperthermie pouvant aller jusqu'au **choc endotoxinique mortel**
- Il n'existe aucun traitement spécifique : traitements symptomatiques

2. Contrôles microbiologiques des eaux de dialyse (23)

Comment détecter/ quantifier les endotoxines ?

Quand rechercher les endotoxines ?

- dans les préparations injectables
- dans les eaux et solutés d'hémodialyse
- dans les aérosols

Au LCP : Lecteur MCS® Charles River laboratoire



- Système rapide de détection des endotoxines : dosage quantitatif des endotoxines dans 5 échantillons simultanés en 15 minutes (lecteur de cartouches)
- Méthode de colorimétrie cinétique par mesure de l'intensité de couleur directement proportionnelle à la quantité d'endotoxines présente dans l'échantillon (mesure de densité optique)

Niveau seuil de concentration en endotoxines

- Eau de la boucle : <0.25 UI/ml
- Dialysat ultrapur : <0.25 UI/ml
 - Infusat : <0.05 UI/ml

3. Essais de stérilité (1)

- Objectif : mettre en évidence la présence de tout micro-organisme contaminant (bactéries aérobies et anaérobies, levures et champignons) dans les substances, produits et préparations qui doivent être stériles selon la Pharmacopée Européenne
- **Validation du processus de fabrication aseptique**



Bonnes Pratiques de Préparation, ANSM :

Préparation aseptique : concerne toutes les préparations pour lesquelles la stérilisation dans le conditionnement final est impossible.

L'objectif de la préparation aseptique est de maintenir la stérilité d'un produit obtenu à partir de composants stériles (matières premières, articles de conditionnement) en utilisant des matériels de préparation stérilisés selon les méthodes décrites à la pharmacopée.

Le moyen d'atteindre cet objectif est d'opérer dans des conditions et au sein d'installations conçues pour empêcher la contamination microbienne, c'est-à-dire dans une zone à atmosphère contrôlée.

3. Essais de stérilité (2)

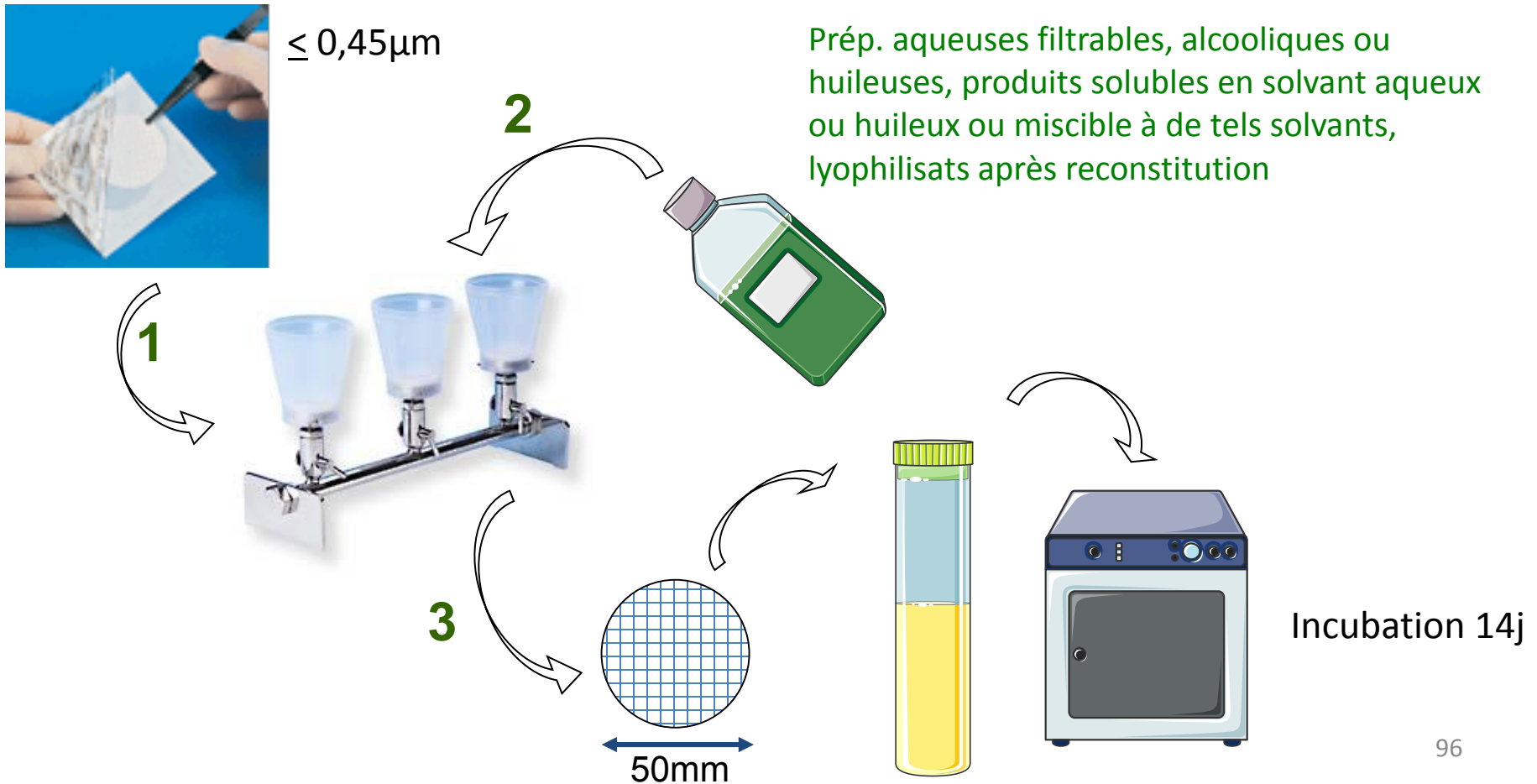
- L'essai de stérilité appliqué à la préparation = le dernier d'une série de contrôles permettant de garantir la stérilité

Pharmacopée européenne : Monographie 2.6.1 « Stérilité »

-Essai de stérilité du produit à examiner : technique de filtration sur membrane est utilisée chaque fois que la nature du produit le permet (préparations aqueuses, huileuses...)

- Membrane de cellulose 0.45um stérile
- Filtre et matériel stériles
- Filtrer l'échantillon (si le produit possède des propriétés antimicrobiennes : rincer la membrane au moins 3 fois)
- Découper la membrane à l'aide de ciseaux et pince stériles en 6 morceaux et déposer chaque morceau dans chacun des 6 tubes de milieux de culture

3. Essais de stérilité (3)



3. Essais de stérilité (5)

Pharmacopée européenne : Monographie 2.6.1 « Stérilité » (suite)

Si absence de croissance dans les 2 tubes du même milieu : **lot conforme**
Si présence de croissance dans l'un des 2 tubes : **essai de stérilité à répéter sur le même nombre d'unités que l'essai initial**

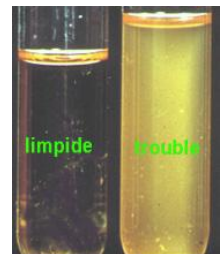
Si présence de croissance dans les 2 tubes du même milieu : **lot non conforme**

Des que culture positive : identification systématique des germes (Maldi-tof)

Milieu Trypticase soja : pour bactéries
aérobies, levures et moisissures



Milieu Thioglycolate : pour bactéries anaérobies,
aérobies, levures et moisissures



Milieu Sabouraud: levures et des
moisissures et inhibe grâce à son acidité,
la croissance de nombreuses bactéries

3. Essais de stérilité (7)

Au LCP : Essais de stérilité réalisés sur :



Des préparations de soude :
utilisée dans le rinçage des pompes à insuline



Des suspensions de progestérone : utilisée en dermatologie chez des patientes présentant une forte suspicion de réactions cutanées à la progestérone

4. Tests de Remplissage Aseptique (1)

- Définition : ensemble de pratiques mises en œuvre par un personnel, consistant à associer plusieurs composants préalablement rendus stériles utilisant des milieux de culture, permettant de qualifier les opérateurs en démontrant l'absence de contamination microbiologique
- Objectif des « TRA » : **Validation de la préparation aseptique = une simulation à l'aide d'un milieu de culture**
- Indications : changement d'équipement, du procédé de fabrication, du procédé de décontamination, changement de personnel (vérification des techniques aseptiques de l'opérateur)...
- Le + proche possible des procédés et avec toutes les étapes de manipulation

4. Tests de Remplissage Aseptique (2)

Kits commerciaux : contenants remplis de bouillon TS (milieu nutritif) permettant la croissance de la plupart des germes non exigeants

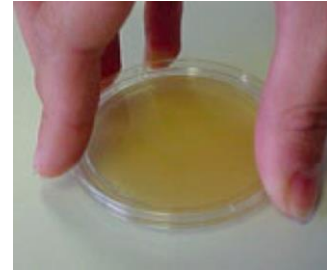


4. Tests de Remplissage Aseptique (3)

- **Validation initiale** : réalisation de 3 TRA successifs sur plusieurs jours (période max de 2 sem) => qualification d'un nouvel opérateur ou lors d'un changement de process de préparation ou d'équipement
- **Validation périodique** : réalisation d'1 TRA par an pour chaque opérateur
- Choix de mimer une préparation considérée comme « à risque » (*worst case*) en terme de contamination microbienne
- Mode opératoire rédigé
- Temps de réalisation similaire à la procédure réelle
- Incubation à 32° C pendant 14 jours; lectures quotidiennes
- En cas de CP: identification systématique

5. Contrôles microbiologiques de surfaces (1)

- Au CHU de Montpellier : Contrôles microbiologiques des surfaces **harmonisés** entre le laboratoire d'hygiène hospitalière (LHH) et le LCP : **contrats d'interface**
 - LHH : contrôles microbiologiques des surfaces des services à risque dans le cadre du plan de surveillance annuel validé par le CLIN
 - LCP : analyses des prélèvements de surfaces (auto-contrôles) réalisés par les manipulateurs des zones de production de médicaments stériles du pôle pharmacie



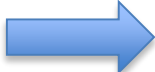
5. Contrôles microbiologiques de surfaces (2)

1. Salle de mise en forme aseptique pharmacie Lapeyronie :

Contrat d'interface entre la pharmacie, le LHH et le LCP :

- Définit les modalités de prélèvements et d'analyses pour les contrôles d'environnements (eau, air, surfaces) et d'équipements (surfaces : hotte à flux laminaire et isolateur) : indications, fréquences, points et sites à prélever...
- Définit les limites recommandées de contamination microbiologique selon la classe de la ZAC :
 - Salle de mise en forme aseptique : classe C (air : bactéries $<100 \text{ UFC/m}^3$ et fungi <1 ; surfaces $<25 \text{ UFC/m}^2$)
 - Isolateur : classe A (surfaces $<1 \text{ UFC/m}^2$)
 - Hotte à flux laminaire : classe A (surfaces $<1 \text{ UFC/m}^2$)

5. Contrôles microbiologiques de surfaces (3)

 **LHH** : contrôles (prélèvements et analyses) **semestriels, hors activité et après bionettoyage**, des surfaces (points aléatoires), eau et air de la salle de mise en forme aseptique et de son SAS + en cas de situation non maîtrisée (maintenance CTA, travaux...)

 **LCP** : analyses des auto-contrôles de surfaces réalisés par les manipulateurs :

- Prélèvements **trimestriels** des surfaces (Countact®) de la salle (23 points codifiés de A1 à A23): objectif = vérifier l'efficacité des procédures d'entretien de l'environnement = rôle pédagogique +++
- Prélèvements, **le jour d'activité de préparation**, des surfaces de l'isolateur (écouvillonnage sec) (14 points codifiés de I1 à I14) : objectif = maîtriser les conditions dans lesquelles sont réalisées les préparations aseptiques; contrôles des surfaces de la hotte si isolateur non utilisable

5. Contrôles microbiologiques de surfaces (4)

Points de contrôle	Codification	Résultat cible attendu
Sol SAS	A1	< 25 UFC/ 25cm ²
Mur SAS	A2	
Meuble SAS	A3	
Poignée SAS porte côté hotte	A4	
Poignée SAS porte isolateur	A5	
Interrupteur SAS	A6	
Poignée intérieure côté hotte	A7	
Poignée intérieure côté isolateur	A8	
Sol côté hotte	A9	
Sol côté isolateur	A10	
Mur côté hotte	A11	
Mur côté isolateur	A12	
Interrupteur côté hotte	A13	
Interrupteur côté isolateur	A14	
Passe-plat côté hotte	A15	
Passe-plat côté isolateur	A16	
Paillasse côté isolateur	A17	
Paillasse thermosoudeuse	A18	
Bras thermosoudeuse	A19	
Paillasse côté hotte	A20	
Stérilisateur	A21	
Isolateur	A22	
Hotte	A23	

Codification des points de contrôles de surface de la salle de mise en forme aseptique

Points de contrôle	Codification	Résultat cible attendu
Parois et grille SAS de stérilisation	I1	< 1 UFC/ 25cm ²
Plan de travail	I2	
Paroi avant, arrière et étagère	I3	
Porte d'entrée	I4	
Gant 1	I5	
Porte de sortie	I6	
Gant 2	I7	
Manchette 2	I8	
Gant 3	I9	
Manchette 3	I10	
Gant 4	I11	
Manchette 4	I12	
Porte SAS sortie côté poignée	I13	
Porte de sortie côté sortie	I14	

Codification des points de contrôles de surface de l'isolateur

5. Contrôles microbiologiques de surfaces (5)

2. Préparatoires pharmacies Lapeyronie et Saint-Eloi:

Contrat d'interface entre la pharmacie, le LHH et le LCP :

-Définit les modalités de prélèvements et d'analyses pour les contrôles d'environnements (surfaces et eau) : indications, fréquences, points et sites à prélever...

- Définit les limites recommandées de contamination microbiologique selon la classe de la ZAC : préparatoire : classe D (surfaces <50 UFC/m²)

LHH : contrôles (prélèvements et analyses) **semestriels et après entretien de l'environnement**, des surfaces (20 points aléatoires) et eau des 2 préparatoires + en cas de situation non maîtrisée (maintenance CTA, travaux...)

LCP : analyses des auto-contrôles de surfaces réalisés par les manipulateurs :

- Prélèvements **trimestriels** des surfaces (Countact®) des préparatoires (20 points codifiés de B1 à B20 pour Lapeyronie et SEL1 à SEL20 pour St Eloi): objectif = vérifier l'efficacité des procédures d'entretien de l'environnement = rôle pédagogique +++

5. Contrôles microbiologiques de surfaces (6)

Points de contrôle Préparatoire pharmacie Lapeyronie	Codification	Résultat cible attendu
Paillasse humide	B1	< 50 UFC/ 25cm ²
Paillasse de manipulation	B2	
Bureau	B3	
Téléphone combiné	B4	
Téléphone oreille	B5	
Paillasse balance Precisa 220	B6	
Paillasse balance Sartorius	B7	
Paillasse uniformité de masse	B8	
Paillasse sèche 1	B9	
Paillasse sèche 2	B10	
Paillasse sèche 3	B11	
Hotte aspirante	B12	
Réfrigérateur	B13	
Poignée porte (intérieure)	B14	
Paillasse laverie (côté humide)	B15	
Paillasse laverie (côté sec)	B16	
Passe-plat (aléatoire)	B17	
Porte placard (aléatoire)	B18	
Porte tiroir	B19	
Bac évier	B20	

Codification des points de contrôles de surface du préparatoire de la pharmacie Lapeyronie

Codification des points de contrôles de surface du préparatoire de la pharmacie St Eloi

Points de contrôle Préparatoire pharmacie Saint-Eloi	Codification	Résultat cible attendu
Bac évier	SEL1	< 50 UFC/25 cm ²
Egouttoir évier	SEL 2	
Paillasse zone de préparation	SEL 3	
Paillasse zone de quarantaine	SEL 4	
Paillasse balance N°1	SEL 5	
Paillasse ordinateur	SEL 6	
Paillasse documents	SEL 7	
Plateau balance N°2	SEL 8	
Téléphone (clavier)	SEL 9	
Téléphone (combiné)	SEL 10	
Interrupteur lumière	SEL 11	
Placard haut	SEL 12	
Tiroir sous paillasse	SEL 13	
Armoire	SEL 14	
Lave-vaisselle	SEL 15	
Poignet intérieure porte	SEL 16	
Réfrigérateur	SEL 17	
Distributeur essuie-mains	SEL 18	
Couvercle poubelle	SEL 19	
Siège roulant	SEL 20	

5. Contrôles microbiologiques de surfaces (7)

3. Radiopharmacies Lapeyronie et Gui de Chauliac:

Contrat d'interface entre la pharmacie, le LHH et le LCP :

-Définit les modalités de prélèvements et d'analyses pour les contrôles d'environnements (eau, air et surfaces) et les TRA: indications, fréquences, points et sites à prélever...

- Définit les limites recommandées de contamination microbiologique selon la classe de la ZAC :
 - Salle de préparation des radiopharmaceutiques : classe C (surfaces < 25 UFC/m²) :
 - Sorbonnes : classe B (surfaces < 5 UFC/m²)
 - Automate injecteur-préleveur : classe C (surfaces externes < 25 UFC/m²)

5. Contrôles microbiologiques de surfaces (8)

 **LHH** : contrôles (prélèvements et analyses) **semestriels en activité** des surfaces (une trentaine de points aléatoires), eau et air des salles de préparation des médicaments radiopharmaceutiques et SAS, salles de marquage cellulaire + en cas de situation non maîtrisée (maintenance CTA, travaux...)

 **LCP** : analyses des auto-contrôles de surfaces réalisés par les manipulateurs :

-Prélèvements, **mensuels, le jour d'activité de préparation**, des surfaces des sorbonnes 2 RDG et 4RDG (écouvillonnage sec, géloses Countact®) et empreintes de gants (géloses Countact®) (points codifiés) : objectif = maîtriser les conditions dans lesquelles sont réalisées les préparations aseptiques

-Prélèvements **mensuels, en activité**, des surfaces de l'automate injecteur-préleveur de Fluor¹⁸ :KARL 100® (écouvillonnage sec, géloses Countact®) (points codifiés) : objectif = maîtriser les conditions dans lesquelles sont réalisées les préparations aseptiques

5. Contrôles microbiologiques de surfaces (9)

Point de prélèvement	Codification	Résultats attendus
Sorbonne 4 RDG LAPEYRONIE		
Empreintes Gant 1	4RDG LAP1	< 5 UFC/25 cm ²
Empreintes Gant 2	4RDG LAP 2	
Empreintes Gant 3	4RDG LAP 3	
Empreintes Gant 4	4RDG LAP 4	
Etagère	4RDG LAP E	
Louche activimètre	4RDG LAP LA	Absence de germes pathogènes et moisissures
Plan de travail entre gants 3 et 4	4RDG LAP PT	< 5 UFC/25 cm ²
Plancher SAS	4RDG LAP S	
Plafond trappe générateur	4RDG LAP PTG	
Sorbonne 2 RDG LAPEYRONIE		
Empreintes Gant 1	2RDG LAP 1	< 5 UFC/25 cm ²
Empreintes Gant 2	2RDG LAP 2	
Etagère	2RDG LAP E	
Plan de travail entre gants 1 et 2	2RDG LAP PT	
Plancher SAS	2RDG LAP S	
Louche activimètre	2RDG LAP LA	Absence de germes pathogènes et moisissures

Codification des points de contrôle de surfaces des sorbonnes de la radiopharmacie Lapeyronie

Point de prélèvement	Codification	Résultats attendus
Sorbonne 4 RDG GUI DE CHAULIAC		
Empreintes Gant 1	4RDG GDC1	< 5 UFC/25 cm ²
Empreintes Gant 2	4RDG GDC2	
Empreintes Gant 3	4RDG GDC3	
Empreintes Gant 4	4RDG GDC4	
Etagère	4RDG GDC E	
Louche activimètre	4RDG GDC LA	Absence de germes pathogènes et moisissures
Plan de travail entre gants 3 et 4	4RDG GDC PT	< 5 UFC/25 cm ²
Plancher SAS	4RDG GDC S	
Plafond trappe générateur	4RDG GDC PTG	
Sorbonne 2 RDG GUI DE CHAULIAC		
Empreintes Gant 1	2RDG GDC1	< 5 UFC/25 cm ²
Empreintes Gant 2	2RDG GDC2	
Etagère	2RDG GDC E	
Obus (intérieur + extérieur)	2RDG GDC O	
Plan de travail entre gants 1 et 2	2RDG GDC PT	
Plancher SAS	2RDG GDC S	
Dessus posiflash	2RDG GDC POSI	
Ascenseur	2 RDG GDC A	

Codification des points de contrôle de surfaces des sorbonnes de la radiopharmacie Gui de Chauliac

5. Contrôles microbiologiques de surfaces (10)

Points de prélèvements	Codification	Résultats attendus
Ecran tactile	K1	< 25 UFC/25 cm ²
Surface externe capot	K2	
Pousse seringue	K3	Absence de germes pathogènes et moisissures
Zone de connexion avec aiguille	K4	
Tiroir du plot	K5	
Dessus du plot	K6	
Dessous du plot	K7	
Poignée du plot	K8	
Dessous du couvercle du plot	K9	

Codification des points de contrôle de surfaces de
l'automate KARL 100®

**IMPORTANT : avec tout envoi de prélèvements :
certificat de non-radiocontamination associé!!!**

6. Identification microbienne en spectrométrie de masse : Maldi-Tof® (1)

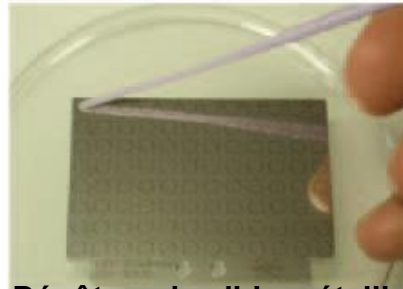


6. Identification microbienne en spectrométrie de masse : Maldi-Tof® (2)

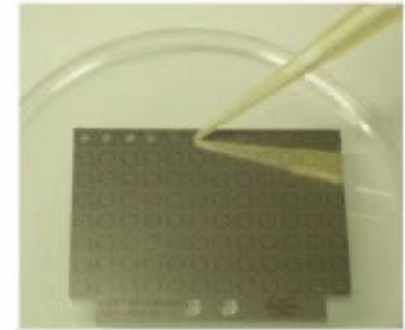


Prélèvement d'une colonie

± étape d'extraction des protéines intracellulaires à l'éthanol absolu et à l'acide formique 70 %



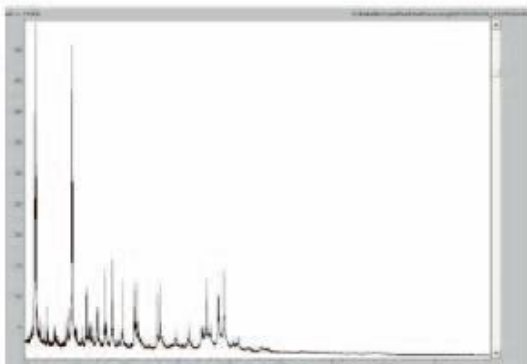
Dépôt sur la cible métallique



Ajout de 1 µL de matrice
(acide -cyano-4-hydroxycinnamique)
puis séchage (2 minutes)



Dépôt des autres colonies
(un morphotype par dépôt)



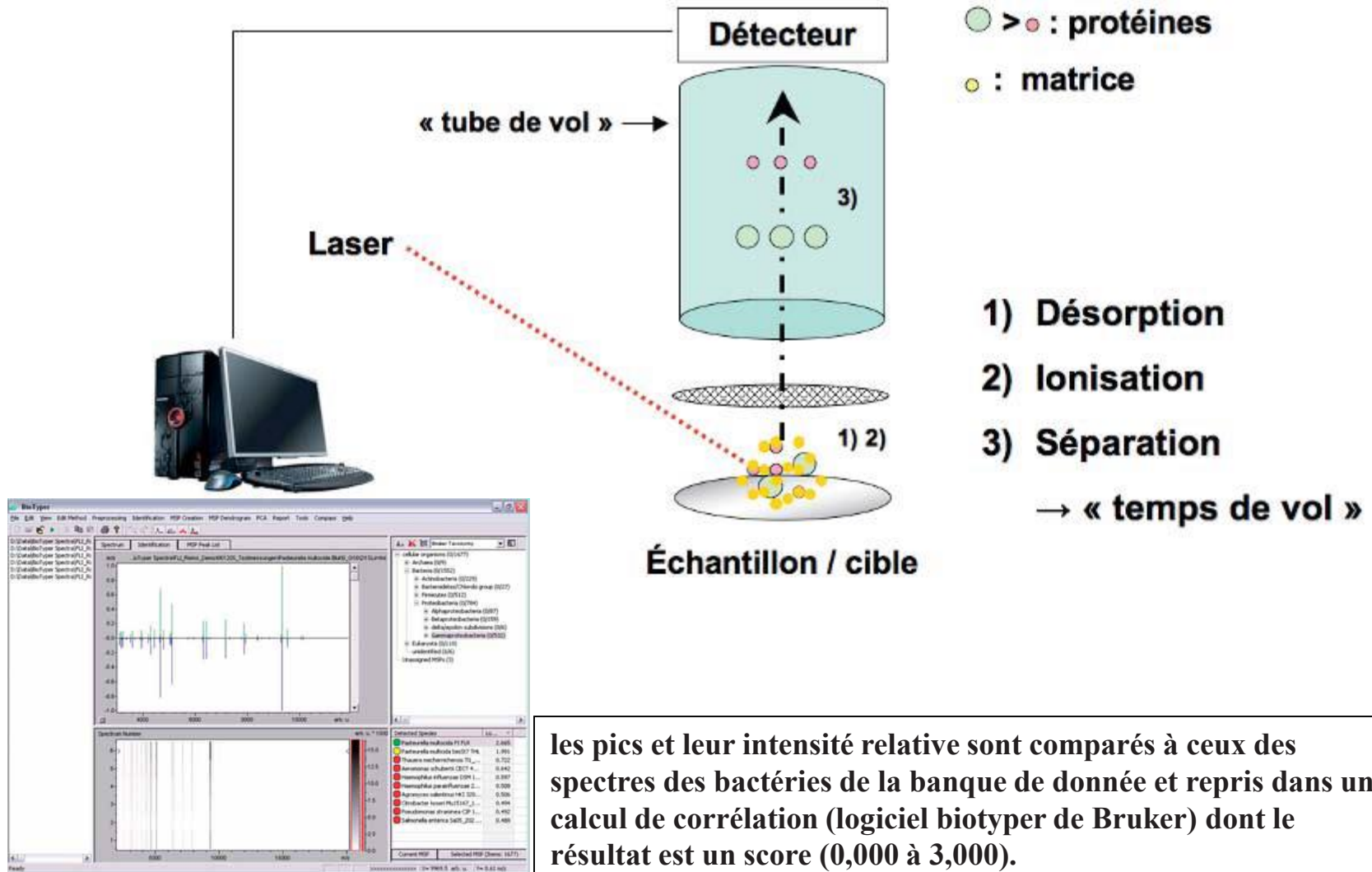
Spectre et interprétation sont obtenus en moins de 2 minutes par dépôt



Introduction de la cible dans l'appareil

6. Identification microbienne en spectrométrie de masse : Maldi-Tof® (3)

Identification des microorganismes par analyse des protéines totales grâce à un logiciel de typage et une banque de données



les pics et leur intensité relative sont comparés à ceux des spectres des bactéries de la banque de donnée et repris dans un calcul de corrélation (logiciel biotyper de Bruker) dont le résultat est un score (0,000 à 3,000).