

# **Analyses microbiologiques**

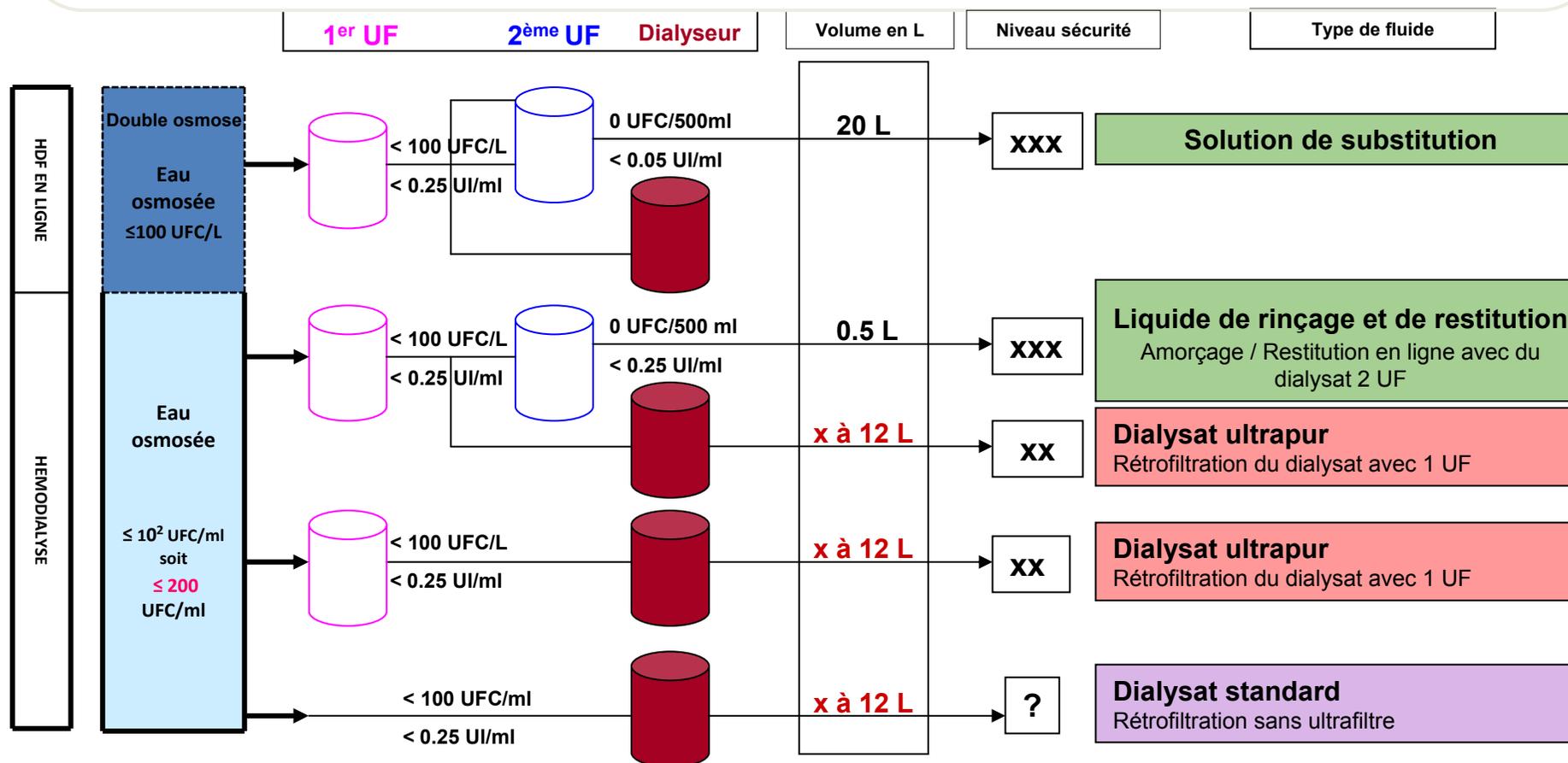
Méthodes et acteurs

*Formation Dialyse  
OMEDIT  
Le 9 Juin 2011*

*Bénédicte Allard  
Pharmacien,  
Association ECHO Nantes*

# LES DIALYSATS

## Les différents processus de production de dialysat injecté



# Récapitulatif des échantillons à analyser selon les techniques

Nature des prélèvements	Rythme et type de contrôles de routine		
	HD conventionnelle	HD avec restitution en ligne	HDF en ligne
Eau osmosée	En fonction nombre de séances Bactéries + endotoxines+ chimie	En fonction nombre de séances Bactéries + endotoxines+ chimie	En fonction nombre de séances Bactéries + endotoxines+ chimie
Dialysat standard	1/an Bactéries + endotoxines+ chimie		
Dialysat ultra pur	1/an Bactéries + endotoxines+ chimie	1/an Bactéries + endotoxines+ chimie	4/an Bactéries + endotoxines+ chimie
Liquide de restitution		1/an Bactéries + endotoxines	
Solution de substitution			4/an Bactéries + endotoxines

# **MISE EN ŒUVRE DES CONTRÔLES ANALYTIQUES**

## **1/ Méthodes des analyses bactériologiques**

# MISE EN ŒUVRE DES CONTRÔLES ANALYTIQUES SUR L'EAU OSMOSÉE

- Recommandations Qualité d'eau osmosée différentes selon les techniques de dialyse pratiquées dans une structure avec le **même** traitement d'eau
- Choix d'une méthode d'analyse bactériologique pour l'eau osmosée quel que soit le type de structure et quelles que soient les techniques de dialyse pratiquées ?

## Méthode d'analyse bactériologique de l'eau pour dilution des solutions concentrées de dialyse

Méthode bactériologique	HD conventionnelle Pharmacopée	HD avec restitution en ligne Pharmacopée	HDF en ligne Circulaire
Milieu de culture	milieu gélosé aux peptones de caséine et de soja	Idem HD conventionnelle	Milieu appauvri type R2A ou TGEA
Température d'incubation	30- 32 °C		20- 22°C
Volume filtré	1 ml + dilutions au 1/10ème		1 LITRE
lecture	3 à 5 jours		7 jours
Limite admissible	≤ 10 <sup>2</sup> UFC/g soit =au maximum 200 UFC/ml		<100 UFC/L

# Etude de l'impact des méthodes sur les résultats d'analyses bactériologiques

OBJECTIF: **Sur une même eau** comparer l'impact des volumes analysés et du changement de milieu sur les résultats d'analyses de **31 structures**

## Étude comparative des méthodes d'analyses bactériologiques sur l'eau pour dilution des solutions concentrées de dialyse

Méthode bactériologique	Méthode 1 HD pharmacopée	Méthode 2 impact Changement de volume	Méthode 3 HDF en ligne
Milieu de culture	Milieu glucose caséine soja	Milieu glucose caséine soja	Milieu appauvri type R2A ou TGEA
Température d'incubation	30- 32 °C	30- 32 °C	20- 22°C
Volume filtré	1ml et 10 ml	1 Litre	1 Litre
lecture	5 jours	5 jours	7 jours
Limite admissible	$\leq 10^2$ UFC/ml	( $10^2$ UFC/ml)	$\leq 100$ UFC/ L
Nombre d'analyses réalisées	77	79	80

# Etude de l'impact des méthodes sur les résultats d'analyses bactériologiques

## Etude comparative des méthodes d'analyses bactériologiques sur l'eau pour dilution des solutions concentrées de dialyse

Méthode bactériologique	Méthode 1 HD GLUCOSE CASEINE SOJA 32°C 5 JOURS FILTRATION 10 ml	Méthode 2 Impact volume GLUCOSE CASEINE SOJA 32°C 5 JOURS FILTRATION 1 litre	Méthode 3 HDF en ligne R2A 22°C 7 JOURS FILTRATION 1Litre
Limite admissible	$\leq 10^2$ UFC/ml	$\leq 10^2$ UFC/ml	$\leq 100$ UFC/L
Nombre d'analyses	77	79	80
conformités	77	72	67
Non conformités ( $\geq 100$ UFC/L)	0	7	13

Annotations de la table :

- Une flèche rouge part de 77 (conformités Méthode 1) vers 7 (non conformités Méthode 2) avec l'étiquette "7 volume".
- Une flèche rouge part de 72 (conformités Méthode 2) vers 7 (non conformités Méthode 2) avec l'étiquette "7 milieu et conditions".
- Une flèche rouge part de 72 (conformités Méthode 2) vers +5 (non conformités Méthode 2) avec l'étiquette "5 volume".
- Une flèche verte part de 72 (conformités Méthode 2) vers 2 (non conformités Méthode 2) avec l'étiquette "2 milieu et conditions".
- Une flèche rouge part de 2 (non conformités Méthode 2) vers +1 (non conformités Méthode 3) avec l'étiquette "Pas de témoin méthode 2".
- Une flèche verte part de 67 (conformités Méthode 3) vers 13 (non conformités Méthode 3) avec l'étiquette "= 13".

## **Conclusion sur les méthodes sur l'eau osmosée**

- Décision d'avoir une méthodologie unique la plus sensible permettant une qualification performante du fluide:
  - Milieu appauvri: R2A
  - 7 jours
  - 20°C- 22°C
  - Filtration 1 litre

Quelque soit le type de traitement de l'eau

Quelque soit la technique de dialyse

Quelque soit le fluide de dialyse analysé

# **MISE EN ŒUVRE DES CONTRÔLES ANALYTIQUES**

## **2/Choix et validation du laboratoire d'analyses**

## CHOIX ET VALIDATION DU LABORATOIRE D'ANALYSES

- **Problématique :**

Plusieurs non-conformités sur le dialysat deux fois ultra filtré lors de la qualification de performances à la réception des générateurs pour le liquide de rinçage et restitution

Exemple d'un site:

Nombre d'analyses bactériologiques effectuées : 21

**Nombre de non conformités bactériologiques (>0) : 15**

- **Défaillances ?**

- Lors du prélèvement ?
- Lors du transport ?
- **Lors de l'analyse ?**

**décision d'auditer le laboratoire d'analyses**

# CHOIX ET VALIDATION LABORATOIRE

## résultat Audit

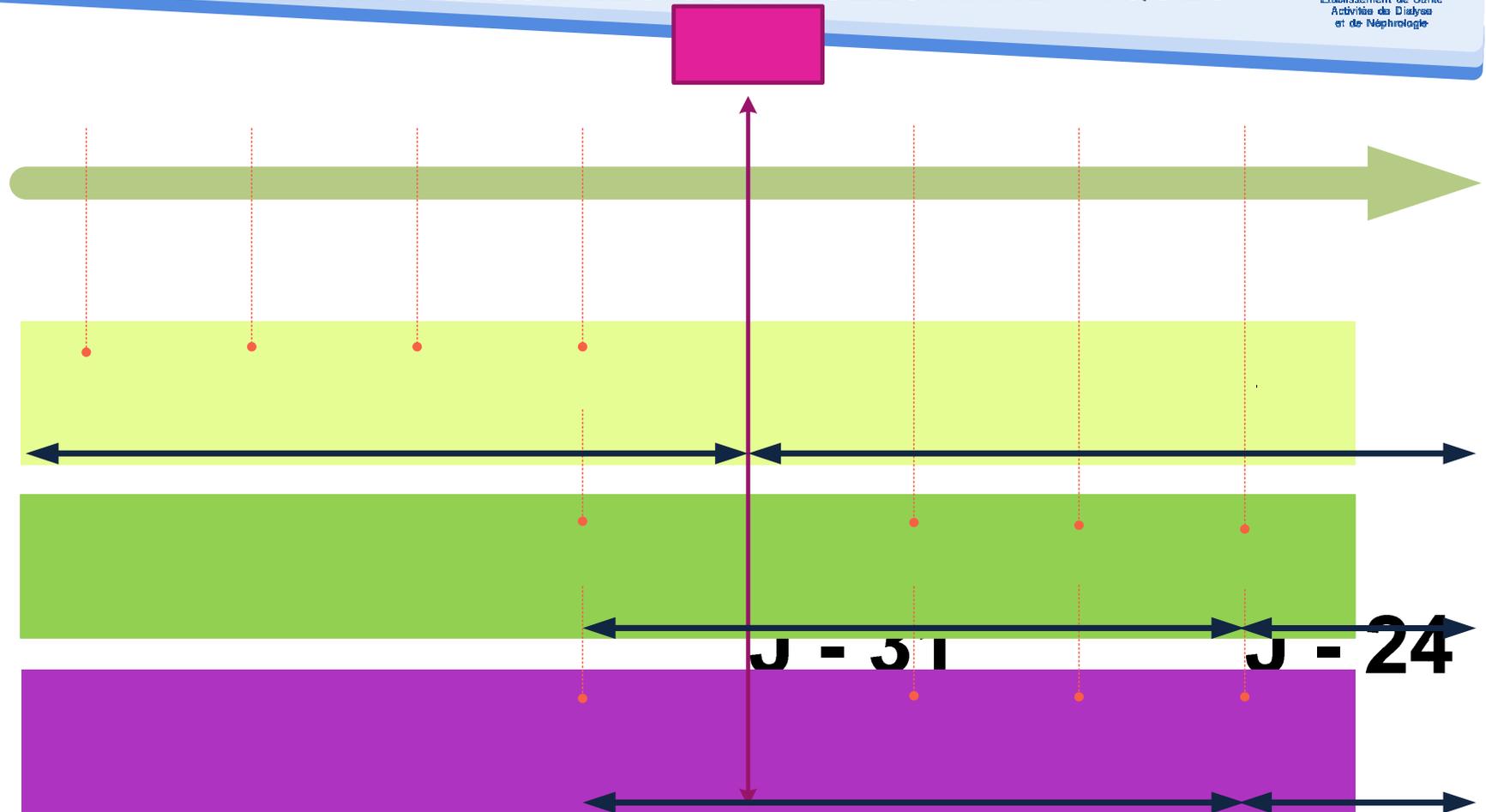
Défaillance probable	Actions proposées
<b>1</b> Mélange des eaux chargées et des eaux non chargées, dialysat standard, ultrapur et dialysats stériles sur une même zone et une même rampe de filtration	Prévoir 3 zones différentes : 1 pour eaux chargées et dialysat standard 1 pour dialysat ultrapur et eau osmosée 1 sous hotte pour les dialysats stériles
<b>2</b> Contamination possible de l'échantillon considéré comme stérile par l'air ambiant ou lors de l'aspiration de l'air en fin de filtration sur membrane 0.45µm	Manipuler sous la hotte à flux laminaire horizontal sortant
<b>3</b> Environnement de la zone d'analyse: porte auprès de la paillasse	Fermer la porte à clé lors des manipulations
<b>4</b> Manipulation non aseptique du luer de la poche de prélèvement	Masque, désinfection des mains puis désinfection du luer avant ouverture et flush avant filtration
<b>5</b> Poche de prélèvement avec un débit faible nécessitant une durée importante de maintien de la poche au-dessus du cornet stérile entraînant un risque de contamination due au contact avec l'embout luer	Transmettre aux fournisseurs pour amélioration des poches de prélèvements
<b>6</b> Conditionnement multiple des cornets stériles	Conditionnement unitaire pour garantir la stérilité du cornet
<b>7</b> Filtration sans couvercle de protection sur le cornet	Mettre un couvercle type boîte de pétri durant la filtration
<b>8</b> Cornet trop petit par rapport au volume à filtrer obligeant à une ouverture multiple de la poche et à une double aspiration de l'air ambiant en fin de filtration	Remplacer cornet de 250 ml par au minima 500 ml

## **Choix du laboratoire d'analyses**

- Suite à l'audit :
  - actions correctrices mises en oeuvre
  - décision de choix d'un autre laboratoire pour tous les dialysats avec exigences microbiologique élevé
- Importance du choix du laboratoire
- Visite indispensable pour valider le laboratoire

# **MISE EN ŒUVRE DES CONTRÔLES ANALYTIQUES**

# REFERENTIELS: RECOMMANDATIONS SUR LES CONTRÔLES ANALYTIQUES



-**Circulaire DGS/DH/AFSSAPS n°337** relative à la diffusion d'un guide pour la production d'eau pour l'hémodialyse des patients insuffisants rénaux. 20 juin 2000. *Bulletin Officiel du Ministère de l'Emploi et de la Solidarité*, 2000, 00/29.

**Circulaire DHOS/E4/AFFSAPS/DGS/2007/52** 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. 30 Janvier 2007. *Bulletin Officiel du Ministère de l'Emploi et de la Solidarité*, 2007, 07/03.

**Norme AFNOR NF S 93-315** : Fluides pour hémodialyse. Exigences et recommandations aux utilisateurs. Novembre 2008.

## Qualification bactériologique et endotoxinique

Nature des prélèvements	Recommandations qualités des fluides		
	HD conventionnelle	HD avec restitution en ligne	HDF en ligne
<i>Eau osmosée</i>	$\leq 10^2$ UFC/ml $\leq 0,25$ UI/ml	$\leq 10^2$ UFC/ml $\leq 0,25$ UI/ml	$\leq 100$ UFC/L
Dialysat standard	$\leq 100$ UFC/ml $\leq 0,25$ UI/ml		
Dialysat ultra pur	$\leq 100$ UFC/ L $\leq 0,25$ UI/ml	$\leq 100$ UFC/ L $\leq 0,25$ UI/ml	$\leq 100$ UFC/L $\leq 0,25$ UI/ml
Liquide de restitution		<b>0 UFC/ 500 ml</b> $\leq 0,25$ UI/ml	
Solution de substitution			<b>0 UFC/ 500 ml</b> $\leq 0,05$ UI/ml

**Pharmacopée européenne**, Addendum 2009- 6.ème édition supplément 6.3- 01/2009 – monographie N°1167 « Solutions concentrées pour hémodialyse (eau pour dilution des) ».

**Pharmacopée européenne**, Addendum 2009- 6.ème édition supplément 6.5- 07/2009 –Méthodes analytiques- 2.6.12 « Contrôle microbiologique des produits non stériles: essais de dénombrement microbien ».

**Circulaire DHOS/E4/AFFSAPS/DGS/2007/52** relative aux spécifications techniques et à la sécurité sanitaire de la pratique de l'hémodifiltration et de l'hémodiafiltration en ligne dans les établissements de santé. 30 Janvier 2007. Bulletin Officiel du Ministère de l'Emploi et de la Solidarité, 2007, 07/03.

# ORGANISATION DES PRELEVEMENTS

## QUOI ?

Quels volumes pour l'analyse bactériologique en fonction des techniques et des fluides ?

	Nature des Echantillons à analyser et volumes filtrés		
	HD conventionnelle	HD avec restitution en ligne	HDF en ligne
Eau osmosée	1 ml	1 ml	1 litre
Dialysat standard	100 ml		
Dialysat ultra pur	100 ml	100 ml	100 ml
Liquide de restitution		500 ml	
Solution de substitution			500 ml

**Référentiels: au minima 1 litre pour l'eau osmosée quand 1 générateur en HDF en ligne dans la structure**

-**Circulaire DGS/DH/AFSSAPS n°337** relative à la diffusion d'un guide pour la production d'eau pour l'hémodialyse des patients insuffisants rénaux. 20 juin 2000. *Bulletin Officiel du Ministère de l'Emploi et de la Solidarité*, 2000, 00/29.

**Circulaire DHOS/E4/AFFSAPS/DGS/2007/52** 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. 30 Janvier 2007. *Bulletin Officiel du Ministère de l'Emploi et de la Solidarité*, 2007, 07/03.

**Norme AFNOR NF S 93-315** : Fluides pour hémodialyse. Exigences et recommandations aux utilisateurs. Novembre 2008.

# **En cas de non-conformité Que faire?**

# Procédure multiprofessionnelle ECHO

## Gestion des non conformités sur les fluides

### DESCRIPTIF DES ACTIONS :

1 = Utilisation du générateur dans la technique

2 = Utilisation du générateur dans la technique en attendant le second contrôle

3 = Limitation du générateur en mode hémodialyse avec restitution en ligne en attendant le second contrôle

4 = Limitation en mode hémodialyse conventionnelle avec poches en attendant le second contrôle

5 = Arrêt de l'utilisation du générateur

### FLUIDES EN HEMODIAFILTRATION EN LIGNE

Eau Osmosée Pour HDF ≤100 UFC/L ≤0,25 UI/ml		Action à effectuer si non-conformité sur l'eau osmosée	FLUIDES EN HEMODIAFILTRATION EN LIGNE		
			Dialysat ultra pur ≤100 UFC/L ≤0,25 UI/ml	Solution de substitution 0 UFC/ 500 ml ≤0,05 UI/ml	Action à effectuer si non-conformité sur le dialysat
Conforme		1	Conforme	Conforme	1
Non-conforme HDF Mais conforme HD (≤10 <sup>2</sup> UFC/ml)		3	Non Conforme	Conforme	2
Non-conforme HDF Non-conforme HD		4	Conforme	Non Conforme	4
			Non Conforme	Non Conforme	5

# CONCLUSION

## Nécessité d'analyser les risques sur les étapes du contrôle

- La méthode de prélèvement
- Le transport
- La méthode d'analyse utilisée
- La fiabilité de la mise en œuvre de la méthode au laboratoire

A ce jour,

les contrôles sur le liquide de substitution sont plus un système de validation des étapes du contrôle qu'une validation de la stérilité du liquide de substitution au vu des délais entre le prélèvement et les résultats et de la réalisation adéquate des séances de dialyse