

Annexe technique

Instructions pour la surveillance microbiologique des Heater-Cooler Devices (HCDs)

1. Généralités

Ces instructions servent d'annexe technique aux « Directives sur l'exploitation et la surveillance des Heater-Cooler Devices (HCDs) en salle d'opération ». Les procédures décrites ci-après servent à la détection de mycobactéries non-tuberculeuses à croissance lente; en particulier de *M. chimaera*. Les mycobactéries à croissance rapide présentes dans les prélèvements environnementaux sont en règle générale inoffensives.

De même sont ici décrites des méthodes microbiologiques visant à la détection des légionnelles et à l'évaluation du nombre total de germes présents dans l'eau. Les analyses approfondies menées sur des échantillons d'eau provenant des HCDs ont en effet démontré qu'il peut exister une contamination microbiologique par des agents autres que des mycobactéries.

Les méthodes mentionnées pour les mycobactéries ont été développées, évaluées et validées au Centre national des mycobactéries (NZM, Université de Zürich, Institut de microbiologie médicale) en collaboration avec les Services d'hygiène hospitalière de l'Hôpital Universitaire de Zürich et des partenaires étrangers dans le cadre d'une collaboration internationale (entre autres les laboratoires de référence en matière de mycobactéries aux Pays-Bas et en Allemagne). Les méthodes utilisées ont été diffusées dans la littérature spécialisée (1, 3-6). Les procédures destinées à la détection des légionnelles et à la détermination du nombre total de germes s'orientent conformément aux mesures applicables en matière d'eau potable de l'Ordonnance sur l'hygiène (RS 817.024.1).

Les laboratoires expérimentés peuvent déroger aux méthodes d'identification énoncées ci-après. En cas d'utilisation de méthodes alternatives et de milieux nutritifs (par exemple Löwenstein-Jensen au lieu des milieux nutritifs Middlebrook mentionnés ci-dessous), des expérimentations de validation devraient être réalisées au préalable afin de définir la sensibilité analytique.

Les analyses doivent être réalisées dans des laboratoires munis d'un système de contrôle-qualité (laboratoire accrédité). Le laboratoire doit avoir une expérience dans les analyses d'échantillons environnementaux et les examens conduits sur ces échantillons doivent entrer dans le champ des activités assujetties à un contrôle-qualité.

2. Préanalytique

2.1 Matériel de prélèvements approprié pour la surveillance microbiologique

- Echantillon d'eau en tube stérile (par exemple Tube TTP 50 ml), volume 50 ml,
- Membrane filtrante en nitrate de cellulose avec un diamètre des pores de 0.45 µm (par exemple Sté. Sartorius, Numéro de commande: 13806-50- ACN) après filtration d'un échantillon d'eau de 1 litre analogue à la norme DIN EN ISO 11731-2:2008,

- Frottis de la surface en tube stérile (par exemple Tube TTP 50 ml),
- Préleveur d'air, boîtes de 90 mm gélose 7H10 Middlebrook après prélèvement d'un échantillon d'air.

2.2 Recommandations pour les prélèvements d'échantillons et de fréquence de contrôle concernant des appareils véhiculant de l'eau dans des zones critiques en matière d'hygiène (salles d'OP, soins intensifs)

Ci-après sont détaillées précisément les mesures préanalytiques à appliquer aux différents prélèvements environnementaux.

- Règle générale valable pour toutes les analyses d'échantillons environnementaux: le moment le plus propice pour réaliser l'analyse est fonction du problème posé, généralement il convient de choisir l'instant où le risque est le plus élevé (= avant la désinfection périodique ou un changement d'eau; pour les échantillons d'air, pendant l'utilisation du HCD).
- Transport des échantillons: le plus rapidement possible jusqu'au laboratoire (maximum 24 heures à partir du moment du prélèvement).
- Y joindre les formulaires de demande d'analyse du laboratoire dûment remplis.
- Conserver les échantillons le plus possible au frais.

2.3 Prélèvements d'échantillons

2.3.1 Prélèvement d'échantillons d'eau 50 ml

- Les appareils alimentés en eau utilisés dans des espaces critiques sur le plan de l'hygiène (salles d'opération, soins intensifs), doivent être vérifiés une fois par mois.
- Les analyses doivent être réalisées antérieurement aux mesures récurrentes de maintenance/désinfection prescrites par le fabricant.
- Doivent être documentés la spécification et les emplacements des sites de prélèvements (éventuellement avec un plan des installations) ainsi que le nom et la qualification du/de la spécialiste ayant entrepris cette vérification (par exemple par le cardio-technicien).
- Les sites de prélèvements doivent être, en vue des analyses, soigneusement identifiés afin d'éviter toute confusion.
- Chaque élément technique distinct d'un appareil contenant de l'eau doit être vérifié séparément (par exemple circuit cardio-vasculaire du patient, circuit cardioplégique des HCDs).
- Les éléments de l'appareil et les tubes à essai doivent être clairement étiquetés avant tout prélèvement d'échantillon.
- L'intérieur des tubes à essai doit être stérile et étanche à l'eau (transport en toute sécurité).
- La quantité minimale à prélever s'élève à 50 ml pour les échantillons d'eau.
- L'instant, les modalités et les résultats de l'analyse des échantillons doivent être documentés de manière traçable.

La documentation des échantillons à disposition du laboratoire et des Services d'hygiène hospitaliers compétents devrait inclure les indications suivantes (portées sur le bon de demande utilisé normalement par le laboratoire):

- Nom, adresse et numéro de téléphone du demandeur,
- Nom et identifiant de l'objet/appareil et du lieu de son site d'exploitation,
- Nom complet de la personne en charge du prélèvement (si possible en caractères d'imprimerie),
- Date et heure du prélèvement,
- Description claire des sites de prélèvement testés.

2.3.2 Prélèvement d'échantillons d'eau 1 litre (sensibilité plus élevée)

Processus analogue, utiliser des récipients stériles d'une contenance de 1 litre

2.3.3 Prélèvement de frottis de la surface

En cas de maintien en exploitation d' HCDs pour lesquels une contamination par *M. chimaera* a été démontrée, prélever des frottis de la surface des appareils en fonctionnement et dans leur environnement immédiat (même espace, emplacement de fonctionnement de l'appareil), afin d'évaluer le risque microbiologique encouru.

Les frottis de la surface sont réalisés à l'aide d'un écouvillon imbibé de NaCl à 0.9% sur une surface de 10x10 cm.

La documentation et la demande d'analyse de laboratoire sont à traiter comme les échantillons d'eau.

2.3.4 Prélèvement d'échantillons d'air

En cas de maintien en exploitation d'HCDs contaminés par *M. chimaera*, une recherche de germes sur des échantillons d'air dans l'environnement immédiat des appareils en fonctionnement (même espace, emplacement de fonctionnement de l'appareil) doit être réalisée, afin d'évaluer le risque microbiologique encouru.

La conception de l'appareil, son mode de fonctionnement et la direction d'expulsion de l'air froid du système de refroidissement de l'air jouent un rôle dans la contamination potentielle de l'air à proximité de celui-ci. Les échantillons d'air doivent donc être prélevés à proximité et dans la direction de leur sortie de l'appareil.

Les échantillons d'air sont collectés au moyen d'un préleveur d'air pour contrôle microbiologiques (par exemple: MAS-100 NT; MBV, Stäfa, Suisse), prévu pour fonctionner dans les conditions de collecte d'air suivantes:

- Durée de la collecte 2.5 minutes,
- Débit d'air: 100 litres/minute,
- Total de la collecte d'air: 250 litres,
- Support de prélèvement: boîte de 90 mm gélose 7H11 Middlebrook.

La documentation et la demande d'analyse de laboratoire sont à traiter comme les échantillons d'eau.

3. Traitement des échantillons pour la recherche de *M. chimaera* en laboratoire

3.1 Réalisation d'un prélèvement d'eau de 50 ml

1. Centrifuger l'échantillon (3'300 x g, 15 minutes, température ambiante) et décanter jusqu'à obtenir environ 5 ml
2. Ajouter 5 ml de solution de décontamination (MycoPrepKit Sté. BD N° de commande: 240862)
3. Bien agiter (Vortex) et retourner deux fois les tubes
Attention: une agitation trop importante oxyde et inactive le NALC (N-acétyl-L-cystéine) présent dans la solution de décontamination!
4. Laisser ensuite les échantillons reposer 15 minutes à température ambiante
5. Pour 30 ml de tampon phosphate (fourni sous forme de poudre à reconstituer dans le MycoPrepKit Sté. BD) remplir jusqu'à 40 ml (pour 20 ml d'échantillon, compléter jusqu'à 50 ml), reboucher soigneusement les tubes, retourner chacun des tubes plusieurs fois manuellement.
6. Centrifuger (3'300 x g, 15 minutes, température ambiante)
7. Décanter avec précaution le surnageant dans la solution désinfectante
8. Afin d'éviter toute contamination, nettoyer le bord avec un tampon imprégné d'alcool à 70%
9. Remettre en suspension le sédiment dans 2 ml de tampon phosphate, bien agiter (Vortex)
10. De cette préparation, transférer 0.5 ml dans un MGIT et ensemencer 0.25 ml sur la gélose 7H11 Middlebrook
11. Les boîtes sont incubées pendant 7 semaines à 37 °C sous 5-10% de CO₂
12. Le matériel restant est stocké en tant qu'échantillon de réserve à +4 °C et conservé jusqu'à obtention du résultat final des analyses.

3.2 Réalisation d'un prélèvement d'eau d'1 litre

Appareils requis:

- Pompe à vide Sartorius N° Art. SM 16692
- Fiole à vide 2 litres Sartorius N° Art. SM 16672
- Dispositif de filtration sous vide Sartorius N° Art. SM 16201
- Flacon de Woulff Sartorius N° Art. SM 16610

Réalisation pratique:

1. Filtrer l'échantillon d'eau (1 litre) sur une membrane filtrante en nitrate de cellulose avec un diamètre des pores de 0.45 µm (Sté. Sartorius N° de commande: 13806-50-ACN).
2. Placer la membrane filtrante en la centrant sur la boîte 90 mm gélose 7H10 Middlebrook et presser légèrement. Les boîtes sont incubées pendant 7 semaines à 37 °C sous 5-10% de CO₂.
3. Contrôler la croissance bactérienne 1x par semaine.

Pour les échantillons d'eau provenant d'appareils identifiés lors des premiers examens comme présentant une contamination polymicrobienne, il peut s'avérer indispensable de procéder à une décontamination préalable de la membrane filtrante:

1. Transférer la membrane filtrante dans un tube stérile (Sté. TTP, 50 ml)

2. Ajouter environ 7 ml de solution de décontamination (MycoPrep Kit Sté. BD - N° de commande: 240862) et traiter le tube dans un bain à ultrasons pendant 1 min. à 50-60 kHz
3. Placer 20 minutes sur l'agitateur-incubateur, puis retirer la membrane filtrante
4. Pour neutralisation, ajouter environ 7 ml de tampon phosphate
5. Centrifuger (3'300 x g, 15 minutes, température ambiante)
6. Eliminer le surnageant, remettre en suspension le sédiment dans 2 ml de tampon phosphate et en ensemercer 0.25 ml sur un milieu de culture solide et 0.5 ml dans un milieu de culture liquide (MGIT milieu liquide avec PANTA et supplément pour favoriser la croissance)
7. Incuber les milieux nutritifs pendant 7 semaines à 37 °C.

3.3 Réalisation des frottis de surface

1. Transférer le frottis dans un tube de 50 ml et compléter avec 5 ml d'eau stérilisée
2. Ajouter 5 ml de solution de décontamination (MycoPrep Kit Sté. BD - N° de commande: 240862)
3. Bien agiter (Vortex) et retourner 2 fois le tube à essai
4. Laisser reposer les échantillons 15 minutes à température ambiante
5. Remplir jusqu'à 40 ml avec 30 ml de tampon phosphate, à partir de cette étape éliminer le tampon ayant servi pour le frottis. Refermer le tube à essai, retourner plusieurs fois manuellement chaque tube.
6. Centrifuger (3'300 x g, 15 minutes, température ambiante)
7. Décanter avec précaution le surnageant dans la solution désinfectante
8. Afin d'éviter toute contamination, nettoyer le bord avec un tampon imprégné d'alcool à 70%
9. Remettre en suspension le sédiment dans 2 ml de tampon phosphate, bien agiter (Vortex)
10. De cette préparation, transférer 0.5 ml dans un MGIT et ensemercer 0.25 ml sur une gélose 7H11 Middlebrook
11. Incuber les milieux nutritifs pendant 7 semaines à 37 °C sous 5-10% de CO₂.
12. Le matériau restant est stocké en tant qu'échantillon de réserve à +4 °C et conservé jusqu'à obtention du résultat final des analyses.

3.4 Traitement des plaques d'accumulation d'air

Les plaques sont incubées durant 7 semaines à 37 °C sous 5-10% de CO₂.

Contrôle de la croissance 1x par semaine.

3.5 Suite de la procédure et établissement d'un rapport:

3.5.1 Présence d'une croissance sur gélose (MGIT ou gélose 7H11 Middlebrook)

1. Sur plaque ou MGIT jugé positif, faire la coloration de Ziehl-Neelsen.
2. En présence de bacilles acido-alcoolo-résistants (BAAR), faire une suspension des colonies dans 3 ml de NaCl à 0.9%.
3. Utiliser 0.5 ml des colonies en suspension pour l'identification moléculaire, extraction d'ADN à l'aide de InstaGene Matrix (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) selon les instructions du fabricant
4. Réaliser une procédure d'identification moléculaire pour déterminer l'espèce; par exemple le protocole « RealTime-16S-rDNA-PCR » avec une sonde qui cible l'ARNr 16S du genre Mycobacterium, suivi par le séquençage de l'amplificat. (1, 2). Ensuite, l'analyse des homologues de séquences ARNr 16S à l'aide d'une base de données (par exemple SmartGene IDNS 16S rDNA Database; SmartGene AG, Zug ou NCBI GenBank). Les séquences 16S de *M.*

chimaera et de *M. intracellulare* diffèrent au niveau d'un seul nucléotide. Ceci permet la distinction des deux espèces (8).

Alternatives:

- a. Systèmes commerciaux d'identification de biologie moléculaire pour les mycobactéries non-tuberculeuses (AID Autoimmun Diagnostika GmbH Mykobakterien Line Blot ou HAIN GenoType Mycobacterium AS). **Attention:** *M. chimaera* est identifié de manière erronée comme *M. intracellulare* par les Line Blots commercialisés. Le NZM peut réaliser l'identification des espèces à la demande.
 - b. Identification MALDI-TOF MS: Bruker Daltonic MALDI Biotyper 3.1 Software, MALDI-Protocole selon A.B. Prana et al. (apranada@labmed.de).
5. Conserver la suspension de culture à 4 °C jusqu'au terme de l'identification de l'espèce.
 6. Utiliser 0.5 ml de cette suspension de pour inoculer un tube MGIT (avec supplément pour favoriser la croissance) et 0.25 ml pour ensemer une gélose 7H11 Middlebrook pour la collection de souches.
 7. En cas d'examen microscopique Ziehl-Neelsen positif à partir du MGIT, ensemer 0.25 ml de l'échantillon positif MGIT sur une gélose au sang cuit afin d'exclure les agents contaminants à croissance rapide.
 8. Conserver le MGIT positif jusqu'à ce que la collecte des souches soit réalisée.
 9. Etablir un rapport sur les mycobactéries identifiées et l'envoyer au demandeur de l'analyse.
 10. Conserver les isolats dans une collection de souches pour d'éventuelles analyses épidémiologiques.

Contamination des milieux nutritifs: Eliminer les milieux nutritifs si on observe une contamination sur > 1/3 des fractions avec des bactéries à croissance rapide, non acido-alcool-résistants ou des moisissures. Réclamer un nouvel échantillon et renouveler l'analyse.

3.5.2 Absence de croissance de mycobactéries au terme de 7 semaines

Etablir un rapport mentionnant "aucune croissance de mycobactéries", si, au terme de 7 semaines d'incubation, aucune croissance de bacilles acido-alcool-résistants n'est constatée.

4. Mise en évidence de la présence de légionnelles

Lors de tests de contrôle, la présence de légionnelles a été identifiée dans quelques appareils HCDs. Nous recommandons donc de réaliser des cultures de contrôle mensuelles avec des échantillons d'eau provenant d'appareils HCDs.

4.1 Préanalytique

Prélèvement d'échantillon d'eau (de 100 ml à 1 litre); analogue aux paragraphes 2.3.1 et 2.3.2.

4.2 Réalisation d'examen en laboratoire

Procédure de filtration selon DIN EN ISO 11731-2:2008:

1. Filtrer l'échantillon d'eau (1 litre) sur une membrane filtrante en nitrate de cellulose avec un diamètre des pores de 0.45 µm (Sté. Sartorius N° de commande: 13806-50-ACN)
2. Poser le filtre sur une gélose GVPC-*Legionella*
3. Incuber pendant 7 jours à 36 °C ± 2 °C sous 5-10% de CO₂
4. Dénumbrer les colonies blanches/grises, bombées (= présomption de *Legionella*)

5. Préparer une sous-culture sur gélose au sang de mouton Columbia et gélose GVPC-*Legionella*
6. Incuber pendant 7 jours à 36 °C ±2 °C sous 5-10% de CO₂
7. Croissance sur GVPC/ Croissance sur sang = absence de *Legionella*
Croissance sur GVPC/absence de croissance sur sang = présomption de *Legionella*
8. Confirmation au moyen d'une identification moléculaire ou de tests d'agglutination au latex
9. Rapport sur l'espèce et les UFC/ml.
10. Faire collection de souches pour d'éventuelles analyses épidémiologiques.

5. Analyses du nombre total de germes dans un échantillon d'eau

Dans certains établissements, des HCDs dont l'eau présentait un aspect trouble ou une décoloration ont été utilisés. Les analyses de l'eau contenue dans ces appareils ont révélé une très forte contamination microbienne, avant tout par *Pseudomonas* sp. et d'autres bacilles à gram négatif non-fermentatifs.

Comme ces appareils doivent être remplis selon les instructions du fabricant avec de l'eau potable filtrée, on peut s'attendre, selon les manipulations techniques et les fonctions de filtration, à l'apparition d'une croissance microbienne. Avec les installations alimentées en eau potable survient une forte dispersion du nombre total de germes (de 0 jusqu'à 1'200 unités formant des colonies [UFC] /ml).

Dans l'appendice 2B de [l'Ordonnance sur l'hygiène suisse](#), le seuil de tolérance fixée pour l'eau potable est de < 300 UFC/ml.

Pour les analyses portant sur l'eau potable, l'OFSP a inclus «La détermination par cytométrie de flux du nombre total de cellules et du rapport quantitatif entre cellules à forte et à faible teneur en acides nucléiques dans l'eau douce» en tant que méthode d'analyse recommandée dans le Manuel Suisse des Denrées Alimentaires (MSDA).

Cette méthodologie a été développée à l'Eawag, Département de microbiologie environnementale, et a été validée en collaboration avec 14 institutions sises en Suisse et à l'étranger.

5.1 Préanalytique

Prélèvement d'échantillon d'eau (de 100 ml à 1 litre); analogue aux paragraphes 3.1 et 3.2.

5.2 Réalisation en laboratoire

Pour une description détaillée, voir:

[Office Fédéral de la Santé Publique 2012: Cytométrie en flux de l'eau potable \(en allemand\)](#)

<https://www.blv.admin.ch/dam/blv/fr/dokumente/lebensmittel-und-ernaehrung/lebensmittelsicherheit/verantwortlichkeiten/durchflusszytometrische-analyse-wasserproben.pdf.download.pdf/durchflusszytometrische-analyse-wasserproben.pdf>

Procédure alternative avec une sensibilité moindre:

Méthodes de filtration (voir paragraphe 4.2) et détermination du nombre de germes aérobies à 37 °C sur milieu nutritif non sélectif.

6. Sources d'informations complémentaires

Centre national des mycobactéries

Université de Zürich

Institut de Microbiologie médicale

Dr. Peter Keller, Directeur-adjoint

Gloriastrasse 30/32

8006 Zürich

Téléphone: +41 44 634 05 16

E-Mail: pkeller@imm.uzh.ch

7. Références

1. **Achermann, Y., M. Rossle, M. Hoffmann, V. Deggim, S. Kuster, D. R. Zimmermann, G. Bloemberg, M. Hombach, and B. Hasse.** 2013. Prosthetic valve endocarditis and bloodstream infection due to *Mycobacterium chimaera*. *Journal of Clinical Microbiology* **51**:1769-1773.
2. **Bosshard, P. P., R. Zbinden, S. Abels, B. Böddinghaus, M. Altwegg, and E. C. Böttger.** 2006. 16S rRNA gene sequencing versus the API 20 NE system and the VITEK 2 ID-GNB card for identification of nonfermenting Gram-negative bacteria in the clinical laboratory. *Journal of Clinical Microbiology* **44**:1359-1366.
3. **Kohler, P., S. P. Kuster, G. Bloemberg, B. Schulthess, M. Frank, F. C. Tanner, M. Rössle, C. Böni, V. Falk, M. J. Wilhelm, R. Sommerstein, Y. Achermann, J. Ten Oever, S. B. Debast, M. J. Wolfhagen, G. J. Brandon Bravo Bruinsma, M. C. Vos, A. Bogers, A. Serr, F. Beyersdorf, H. Sax, E. C. Böttger, R. Weber, J. van Ingen, D. Wagner, and B. Hasse.** 2015. Healthcare-associated prosthetic heart valve, aortic vascular graft, and disseminated *Mycobacterium chimaera* infections subsequent to open heart surgery. *European Heart Journal* **36**:2745-2753.
4. **Sax, H., G. Bloemberg, B. Hasse, R. Sommerstein, P. Kohler, Y. Achermann, M. Rössle, V. Falk, S. P. Kuster, E. C. Böttger, and R. Weber.** 2015. Prolonged Outbreak of *Mycobacterium chimaera* Infection After Open-Chest Heart Surgery. *Clinical Infectious Diseases* **61**:67-75.
5. **Schreiber, P. W., S. P. Kuster, B. Hasse, C. Bayard, C. Rüegg, P. Kohler, P. M. Keller, G. V. Bloemberg, F. Maisano, D. Bettex, M. Halbe, R. Sommerstein, and H. Sax.** 2016. Reemergence of *Mycobacterium chimaera* in Heater-Cooler Units despite Intensified Cleaning and Disinfection Protocol. *Emerging Infectious Diseases* **22**:1830-1833.
6. **Sommerstein, R., C. Rüegg, P. Kohler, G. Bloemberg, S. P. Kuster, and H. Sax.** 2016. Transmission of *Mycobacterium chimaera* from Heater-Cooler Units during Cardiac Surgery despite an Ultraclean Air Ventilation System. *Emerging Infectious Diseases* **22**:1008-1013.
7. **Tortoli, E., L. Rindi, M. J. Garcia, P. Chiaradonna, R. Dei, C. Garzelli, R. M. Kroppenstedt, N. Lari, R. Mattei, A. Mariottini, G. Mazzarelli, M. I. Murcia, A. Nanetti, P. Piccoli, and C. Scarparo.** 2004. Proposal to elevate the genetic variant MAC-A, included in the *Mycobacterium avium* complex, to species rank as *Mycobacterium chimaera* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **54**:1277-1285.