



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE



Université ABOU BEKR BELKAÏD Tlemcen
Faculté des sciences de la nature et de la vie et sciences de la terre et de l'univers
Département de Biologie
Laboratoire de microbiologie appliquée à l'agroalimentaire au biomédical et l'environnement
(LAMAABE)

THESE

Présentée par

M. Touhami MORGHAD

En vue de l'obtention du diplôme de
Doctorat en Biologie

Option : Microbiologie
Intitulée :

**Evaluation de la contamination bactérienne et caractérisation de biofilms
mixtes isolés de tubulures d'eau de dialyse CHU – Tlemcen**

Soutenu le : 13 / 09 / 2023 à 09h dans l'auditorium de la faculté SNV/STU

Devant le jury

Président	M. REBIAHI Sid Ahmed	Professeur. Université de Tlemcen
Directrice de thèse	Mme. HASSAINE Hafida	Professeur. Université de Tlemcen
Examineurs	M. DJIBAOUI Rachid	Professeur. Université de Mostaganem
	M. GHELLAI Lotfi	MCA. Université Saïda
	Mme. KARA TERKI Ibtissem	MCA. Université Sidi Bel Abbès
	Mme. BELLIFA Samia	MCA. Université de Tlemcen

Année universitaire 2022/2023

Remerciements

Merci Mon Dieu

Je tenais à remercier l'ensemble des personnes qui ont contribué à ce travail de recherche et celles qui m'ont soutenu et supporté.

Professeur HASSAINE Hafida, j'ai vraiment apprécié de travailler avec vous. Votre avis et votre analyse critique ont contribué à alimenter ma réflexion. Être encadré par vous durant toute ma carrière universitaire a été pour moi une grande fierté. Je vous remercie infiniment

Professeur REBIAHI Sid Ahmed, Je vous remercie d'avoir accepté d'être dans ce jury et c'est un grand honneur pour moi de vous avoir comme président du jury. Je vous remercie une deuxième fois pour votre aide.

Professeur DJIBAOUI Rachid, je vous remercie d'avoir accepté d'être examinateur de cette thèse, Je recevrai vos critiques avec la plus grande attention afin de profiter de votre savoir scientifique.

Docteur GHELLAI Loti, je vous remercie d'avoir accepté de juger ce travail. Merci pour vos travaux pratique de microbiologie générale (année universitaire 2006/2007)

Docteur KARA TERKI Ibtiissam, Je tiens à vous exprimer ma sincère gratitude pour l'intérêt que vous avez porté à ce travail en acceptant d'en être l'une des examinatrices.

Docteur BELLIFA Samia, Je tiens à vous exprimer ma profonde reconnaissance merci d'avoir accepté de juger ce travail. Merci pour votre aide au laboratoire.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

A mes très chers parents

A ma femme et mon fils

A mes Frères et ma Sœur

A ma grande famille

A mon encadreur Hafida HASSAINE

A mes amis (es).

A tous les membres du LAMAAABE

Touhami

Tables des matières

الملخص

Résumé

Summary

Liste des abréviations

Liste des Figures

Liste des Tableaux

Introduction	1
Première partie : Synthèse bibliographique	3
Chapitre 1 : Hémodialyse	4
1. Définition de l'hémodialyse	4
2. Historique de dialyse	4
3. Principe d'hémodialyse	4
4. Processus de purification de l'eau pour hémodialyse	5
5. Standards pour la qualité de l'eau de dialyse	7
5.1 Contamination chimique	8
5.2 Contamination microbienne	9
Chapitre 2 : Biofilm et hémodialyse	10
1. Définition du biofilm	10
2. Etapes de formation du biofilm	10
2.1 Adhésion réversible	11
2.2 Adhésion irréversible	11
2.4 Maturation	11
2.5 Dispersion du biofilm	11
3. Sites du développement du biofilm dans le circuit de fluide d'hémodialyse	12
4. Conséquences des biofilm en hémodialyse	13
5. La désinfection	14
Chapitre 3 : Biofilms mixtes	15
1. Définition	15
2. Conséquences de biofilms mixtes	16
2.1 L'effet protecteur des biofilms multi-espèces	16
2.2 Booster la virulence	16
2.3 Dégradation des composés organiques et polluants	17

Deuxième partie : Matériel et méthodes	18
1. Cadre de l'étude	19
2. Procédure d'échantillonnage de l'eau	19
3. Dénombrements	19
4. Identification des isolats.....	20
5. Traitement des sections de tubulures d'eau reliant la boucle aux machines de dialyse.....	21
5.1 Dénombrement de la flore adhérente	21
5.2 Evaluation des souches isolées à former un biofilm	22
6. Etude de résistance aux désinfectants	22
7. Microscopie électronique à balayage	23
8. Étude de biofilms mixtes.....	23
Troisième partie : Résultats et discussion	25
1. Résultats de la qualité microbiologique de l'eau de dialyse	26
2. Résultats identification bactérienne	30
3. Résultats de l'écologie microbienne par machine de dialyse.....	32
4. Résultats capacité de formation de biofilm	33
5. Résultats CMI désinfectant OXY ANIOLYSE 9000 (acide peracétique et peroxyde d'hydrogène.....	34
6. Imagerie de biofilm des souches bactériennes isolées des tubulures d'eau de dialyse	37
7. Evolution des cultures mixtes planctoniques	42
8. Evolution des cultures mixtes en mode biofilm	45
9. Evolution des cultures en biofilms mixtes par la méthode du cristal violet.....	51
Conclusion et perspectives	53
Références bibliographique	58
Annexes	75

المخلص

تتناول هذه الدراسة جودة المياه الميكروبيولوجية لمياه الغسيل الكلوي في مستشفى تلمسان. تم أخذ عينات من المياه لمدة 5 أشهر لتقييم جودة المياه الميكروبيولوجية لمياه الغسيل الكلوي. تشير النتائج إلى أن جودة المياه في حلقة التوزيع غير مقبولة، بمتوسط عدد بكتيريا يصل إلى 118 CFU / mL ، نلاحظ ان المياه عند مدخل آلات الغسيل الكلوي تحتوي على تركيزات بكتيرية أعلى من المستويات الموصى بها (100UFC/mL) أي بمتوسط 182 mL /UFC. يجب اتخاذ إجراءات تصحيحية للتطهير والتنظيف لتحسين جودة مياه الغسيل الكلوي وتقليل مخاطر التلوث البكتيري للمرضى.

تكون المياه عند مدخل الآلات هي الأكثر تلوثاً بسبب نمو البكتيريا في الفيلم الحيوي الموجود في أنابيب البي في سي المرتبطة بالآلات. تكون مستويات التلوث في هذه الأنابيب عالية جداً، بعدد بكتيريا مرتبط يصل إلى 10^6 UFC/cm² ، وهو يمثل خطراً على صحة المرضى الذين يتلقون الغسيل الكلوي. الأنواع البكتيرية الأكثر شيوعاً هي *Bacillus* ، *Enterobacter cloacae* ، *Staphylococcus* ، *Klebsiella pneumoniae* ، *Pseudomonas aeruginosa* و *Acinetobacter baumannii*.

يعدّ الغشاء الحيوي مشكلة كبيرة في أنظمة الغسيل الكلوي، لكن هناك قليل جداً من الدراسات التي تهتم بهذا الموضوع. تكون سطوح مسارات السوائل الكلوية عرضة للغزو البكتيري. يُعد معظم السلالات المعزولة من الأنابيب هي نفسها التي تم عزلها من مياه الغسيل الكلوي، ولديها صفة الإنتاج الزائد للفيلم الحيوي. تؤكد صور المجهر الإلكتروني المسحي هذه القدرة على تكوين الفيلم الحيوي. تحتاج 34٪ من السلالات المعزولة من أنابيب المرتبطة بالجهاز إلى تركيز أعلى من تركيز المطهر المستخدم والموصى به من قبل المورد.

لا يتضمن تكوين الأغشية الحيوية على دعائم لا حيوية نوعاً واحداً من البكتيريا ولكنها في الكثير من الأحيان مختلطة تشمل عدة أنواع من البكتيريا. بعد تجاربنا المخبرية لإعادة إنتاج الأفلام المختلطة (نوعان)، نستنتج أنها ظاهرة معقدة جداً. وفقاً لتركيبات الأنواع المختلفة من البكتيريا، تتفاعل هذه الأنواع إما بتأثيرات تعاونية أو عدائية. تكون نمو بعض الأنواع في الأغشية المختلطة أعلى من نموها في أغشية أحادية النوع. تُظهر التفاعلات بين *Pseudomonas aeruginosa* و *Staphylococcus epidermidis* منافسة على العناصر الغذائية ، مما يؤدي إلى بطء نمو *S. epidermidis*. بالمقابل، يتعايش *Staphylococcus aureus*

في النهاية، من الضروري الحفاظ على بروتوكولات التعقيم والتنظيف المناسبة لمعدات الغسيل الكلوي ومراقبة جودة المياه وكذلك وجود الأغشية الحيوية بانتظام.

كلمات مفتاحية: مياه الغسيل الكلوي، الجودة الحيوية، حلقة التوزيع، آلات الغسيل الكلوي، CMI، المطهرات، الأغشية الحيوية، الأغشية الحيوية المختلطة، مستشفى تلمسان.

Résumé

Cette étude porte sur la qualité microbiologique de l'eau de dialyse au CHU Tlemcen. Des prélèvements d'eau pendant 5 mois ont été effectués afin d'évaluer la qualité microbiologique de l'eau de dialyse. Les résultats montrent que la qualité de l'eau à la boucle de distribution n'est pas acceptable avec un nombre moyen de 118 UFC/mL, l'eau à l'entrée des machines de dialyse présente des nombres plus élevés de bactéries, dépassant les limites recommandées (100 UFC/mL) avec un moyen de 182 UFC/mL. Les actions correctives de désinfection et nettoyage pour améliorer la qualité de l'eau de dialyse et réduire les risques de contamination bactérienne pour les patients sont indispensables.

L'eau à l'entrée des machines est plus contaminée en raison de la croissance de bactéries dans le biofilm présent dans les tuyaux en PVC reliant machines de dialyse à la boucle. Le niveau de contamination dans ces tuyaux est très élevé, avec un nombre de bactéries adhérentes allant jusqu'à 10^6 UFC/cm², ce qui représente un danger réel pour la santé des patients dialysés. Les bactéries les plus fréquemment retrouvées sont le *Bacillus*, *Enterobacter cloacae*, les staphylocoques, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii*.

Le biofilm est un problème majeur dans les systèmes d'hémodialyse, mais très peu d'études s'intéressent à ce sujet. Les surfaces des voies de liquide de dialyse sont toutes susceptibles à l'invasion de biofilm. La plupart des souches isolées des tubulures des machines sont les mêmes de celles isolées de l'eau de dialyse et elles ont la tendance d'être hyper-productrices de biofilm. L'imagerie par microscopie électronique à balayage confirme cette capacité de formation de biofilm. 34% des souches isolées des tubulures nécessitent une concentration supérieure à la CMI de désinfectant utilisé et recommandée par le fournisseur.

La formation de biofilms sur support abiotique n'implique jamais une seule espèce bactérienne mais très souvent elle est mixte impliquant plusieurs espèces de bactéries. Suite à nos essais *in vitro* de reproduire des biofilms mixtes (deux espèces), nous concluons que c'est un phénomène très complexe. Selon la combinaison des différentes espèces de bactéries, celles-ci interagissent soit avec des effets synergétiques ou antagonistes.

La croissance de certaines espèces en biofilms mixtes est supérieure à leur croissance en biofilms mono espèce. L'interaction entre *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus epidermidis* montre une compétition pour les nutriments, qui conduit à une croissance plus lente de *S. epidermidis*. En revanche, *S. aureus* cohabite avec *P. aeruginosa* avec des charges bactériennes plus élevées.

Enfin, il est primordial de maintenir des protocoles de désinfection et de nettoyage appropriés pour les équipements de dialyse et de surveiller régulièrement la qualité de l'eau et la présence de biofilms.

Mots clés : eau de dialyse, qualité microbiologique, boucle de distribution, machines de dialyse, CMI de désinfectant, biofilm, biofilm mixte, CHU Tlemcen

Summary

This study focuses on the microbiological quality of dialysis water at CHU Tlemcen. Water samples were collected for 5 months to evaluate the microbiological quality of dialysis water. The results show that the quality of water in the distribution loop is not acceptable, with an average bacterial count of 118 CFU/mL, while the water at the entrance of dialysis machines has higher counts exceeding recommended limits (100 CFU/mL) with an average of 182 CFU/mL. Corrective disinfection and cleaning actions to improve dialysis water quality and reduce bacterial contamination risks for patients are essential.

Water at the entrance of machines is more contaminated due to bacterial growth in the biofilm present in PVC pipes connecting the dialysis machines to the loop. The contamination level in these pipes is very high, with a count of adhered bacteria up to 10^6 CFU/cm², representing a hazard to the health of dialysis patients. The most frequently bacteria founded are *Bacillus*, *Enterobacter cloacae*, *Staphylococci*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter baumannii*.

Biofilm is a major problem in hemodialysis systems, but very few studies address this issue. The surfaces of the dialysis fluid pathways are all susceptible to biofilm invasion. Most strains isolated from machine tubing are the same as those isolated from dialysis water and tend to be hyper-biofilm producers. Scanning electron microscopy confirms this biofilm formation capacity. 34% of strains isolated from tubing require a higher disinfectant concentration than that recommended by the supplier.

Biofilm formation on abiotic support never involves a single bacterial species, but it is often mixed involving several bacterial species. Following in vitro experiments to reproduce mixed biofilms (two species), we conclude that this is a very complex phenomenon. Depending on the combination of different bacterial species, they interact either with synergistic or antagonistic effects.

The growth of some species in mixed biofilms is superior to their growth in mono-species biofilms. The interaction between *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus epidermidis* shows competition for nutrients, leading to slower growth of *S. epidermidis*. On the other hand, *S. aureus* coexists with *P. aeruginosa* with higher bacterial loads.

In conclusion, it is essential to maintain appropriate disinfection and cleaning protocols for dialysis equipment and to regularly monitor water quality and the presence of biofilms.

Keywords: dialysis water, microbiological quality, distribution loop, dialysis machines, disinfectant MIC, biofilm, mixed biofilm, CHU Tlemcen.

Liste des abréviations

AAMI: Association for the Advancement of Medical Instrumentation

ADN : Acide désoxyribonucléique

Api 20E : Appareils et Procédés d'Identification des Entérobactérie

BHIB : Brain Heart Infusion broth (bouillon cœur-cerveille)

CHU : Centre hospitalo universitaire

CMI : Concentration minimale inhibitrice

DO : Densité optique

EPS : Extracellular polymeric substances (substances exo-polymériques)

Log : Logarithme décimal

PE : Pharmacopée européenne

R2A: Reasoner's 2A Agar

SPA: Staphylococcal protein A

UFC : unité formant colonie

UI : Unité internationale

UV : Ultraviolet

Liste des figures

Figure 1 : Les principaux équipements du système de traitement d'eau en hémodialyse	6
Figure 2 : Etapes de formation de biofilm	10
Figure 3 : Sites de prélèvements.....	19
Figure 4 : Technique de dénombrement par filtration.....	20
Figure 5 : Technique de dénombrement des bactéries adhérentes sur tubulures de machine de dialyse.....	21
Figure 6 : Capacité de formation de biofilm sur microplaque	22
Figure 7 : Dénombrement bactérien de l'eau de dialyse prélevée de la boucle de distribution par mois.....	27
Figure 8 : Dénombrement bactérien de l'eau de dialyse prélevée à l'entrée des différentes machines de dialyse.....	27
Figure 9 : Dénombrement bactérien de l'eau de dialyse à l'entrée des générateurs et la charge microbienne adhérente sur 1 cm ² de tuyaux reliant la boucle aux générateurs	28
Figure 10 : Pourcentages des souches isolées de l'eau de boucle, de l'eau entrée générateurs de la dialyse et du biofilm (tubulures)	31
Figure 11 : Répartition des souches identifiées dans l'eau à l'entrée des machines et dans les biofilm par machines	33
Figure 12 : Capacité de formation de biofilm chez les souches isolées des tubulures.....	34
Figure 13 : Images de microscopie électronique de formation de biofilm d' <i>Enterobacter cloacae</i> sur tubulures de machines de dialyse après 24 heures (A [X 6000] et B [X 8000])...	38
Figure 14 : Images de microscopie électronique de formation de biofilm de <i>Klebsiella pneumoniae</i> sur tubulures d'eau de machines de dialyse après 24 heures (A [X 4000] et B [X 10000])	38
Figure 15 : Images de microscopie électronique de formation de biofilm de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> sur tubulures d'eau de machines de dialyse après 24 heures (A [X 4000] et B [X10000]).....	39
Figure 16 : Images de microscopie électronique de formation de biofilm d' <i>Acinetobacter baumannii</i> sur tubulures d'eau de machines de dialyse après 24 heures (A [X 5000] et B [X10000]).....	39
Figure 17 : Images de microscopie électronique de formation de biofilm de <i>Staphylococcus aureus</i> sur tubulures d'eau de machines de dialyse après 24 heures (A [X 2500], B [X 5000], C [X10000])	40

Figure 18 : Images de microscopie électronique de formation de biofilm de <i>Staphylococcus epidermidis</i> sur tubulures d'eau de machines de dialyse après 24 heures (A [X 1200], B [X10000]).....	40
Figure 19 : Images de microscopie électronique de formation de biofilm de <i>Bacillus cereus</i> sur tubulures d'eau de machines de dialyse après 24 heures (A[X 1500], B [X 5000], C [X10000])	41
Figure 20 : DO de la phase planctonique d' <i>E. cloacae</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> en culture mono-espèces et mixte	44
Figure 21 : DO de la phase planctonique d' <i>A. baumannii</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> en culture mono espèces et mixte.....	44
Figure 22 : DO de la phase planctonique de <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> en culture mono espèces et mixte	44
Figure 23 : DO de la phase planctonique de <i>K. pneumoniae</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> en culture mono espèces et mixte	44
Figure 24 : Evolution du nombre d' <i>E. cloacae</i> , <i>S. aureus</i> et <i>S. epidermidis</i> dans des biofilms mono-espèce et mixte.....	46
Figure 25 : Evolution du nombre d' <i>A. baumannii</i> , <i>S. aureus</i> et <i>S. epidermidis</i> dans des biofilms mono-espèce et mixte.....	46
Figure 26 : Evolution du nombre de <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> et <i>S. epidermidis</i> dans des biofilms mono-espèce et mixte	46
Figure 27 : Evolution du nombre de <i>K. pneumoniae</i> , <i>S. aureus</i> et <i>S. epidermidis</i> dans des biofilms mono-espèce et mixte	46
Figure 30 : Densité optique de biofilms mixtes d' <i>E. cloacae/S. aureus</i> et <i>E. cloacae/S. epidermidis</i>	52
Figure 31 : Densité optique de biofilms mixtes d' <i>A. baumannii/S. aureus</i> et <i>A. baumannii/S. epidermidis</i>	52
Figure 32 : Densité optique de biofilms mixtes de <i>P. aeruginosa/S. aureus</i> et <i>P. aeruginosa/S. epidermidis</i>	52
Figure 33 : Densité optique de biofilms mixtes de <i>K. pneumoniae/S. aureus</i> et <i>K. pneumoniae /S. epidermidis</i>	52

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Les concentrations maximales des contaminants chimiques admises dans l'eau de dialyse	8
Tableau 2 : Les genres microbiens les plus retrouvés dans les eaux de dialyse	9
Tableau 3 : Désinfectants utilisés dans le système de dialyse	14
Tableau 4 : Souches isolées de l'eau de boucle, à l'entrée des générateurs et segments de tubulure.....	31
Tableau 5 : Résultats CMI désinfectants des souches testées	35

Introduction

Introduction

Au cours des dernières années, le nombre de patients concernés par l'hémodialyse a augmenté dans le monde entier, cette technique est la modalité de traitement la plus efficace pour les patients souffrant de maladies rénales [(Dadgari et al., 2015) ; (Ebrahimi et al., 2016) ; (Chuasuwana et al., 2020)].

Les séances de dialyse durent entre 4 et 6 heures où les patients sont exposés annuellement de manière non sélective à des volumes entre 15000-20000 litres de liquide de dialyse. Par conséquent, toutes les substances de faible poids moléculaire présentes dans l'eau ont un accès à la circulation sanguine du patient [(Locatelli et al., 2010) ; (Shafi et al., 2020)].

L'échec des systèmes de traitement de l'eau de dialyse, dont la filtration et l'osmose inverse, ainsi que les méthodes de désinfection de la boucle et les machines de dialyse sont à l'origine de la majorité des bactériémies, septicémies et des réactions pyrogènes contractées au cours de l'hémodialyse [(Jackson et al., 1994); (Smeets et al., 2003); (Ducki et al., 2005) ; (Schiavano et al., 2014)].

Il a été rapporté que dans l'eau de dialyse, la plus grande incidence est celle des bactéries à Gram négatif telles, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* et *Burkholderia cepacia*, et les Gram positif tels, *Bacillus* et *Staphylococcus* en plus quelques champignons et protozoaires [(Gomila et al., 2005) ; (Vanegas et al., 2019)]. Ces microorganismes peuvent se multiplier rapidement, même dans l'eau. Dans les solutions d'hémodialyse, cette croissance bactérienne devient plus rapide en raison de la présence de glucose et de bicarbonate, qui conduirait à de fortes concentrations d'endotoxines [(Pisani et al., 2000); (Vinhas et Santos, 2000)].

La contamination bactérienne des systèmes de traitement et distribution d'eau de dialyse peut entraîner la formation de biofilms. La station de traitement d'eau est composée de divers types de matériel de tuyauteries, coudes, boucles, bras morts et réservoirs de stockage qui peuvent être un environnement idéal pour la formation de biofilms (Abbass et al., 2018).

La présence des biofilms mixtes est préoccupante en raison de la persistance bactérienne dans les différents points du système, du relargage continu des bactéries et de l'acquisition d'une résistance élevée des bactéries sessiles contre les désinfectants qui peuvent être multiplié par 3 000, que leurs homologues planctoniques, aux agents bactériostatiques additionnés [(Simoes-Silva et al., 2018); (Smeets et al., 2003) ; (Zunino et al., 2002)].

Les biofilms développés sur la surface interne de la tubulure des liquides de dialyse présentent un risque significatif pour la santé des patients. Cela est dû au détachement continu du biofilm, causant une libération importante, et imprévisible, de bactéries et d'endotoxines bactériennes [(Favero, 1974) ; (Coulliette et Arduino, 2013) ; (Shawn *et al.*, 2019)].

Pour réduire le risque infectieux de ces biofilms, ils doivent être bannis de la surface des systèmes de dialyse, comme n'importe quel dispositif médical car aucun nettoyage et/ou procédé de désinfection disponible présente l'efficacité nécessaire.

De nos jours, les centres d'hémodialyse contrôlent la contamination de l'eau de dialyse et quelques-uns contrôlent également le dialysat, mais le développement du biofilm mixte à l'intérieur des tuyaux et des machines de dialyse n'est pas pris en compte. De plus, le changement des tubulures n'est que très rarement ou pas du tout effectué.

Dans cette étude, première en Algérie, notre objectif était de déterminer et de comparer la qualité microbiologique de l'eau à la boucle de distribution et à l'entrée du générateur de dialyse. En isolant et en identifiant les bactéries à Gram négatif et à Gram positif et d'étudier la prévalence de bactéries adhérees à partir de sections de tubulure de jonction des générateurs et boucle de dialyse dans une unité d'hémodialyse du centre hospitalo-universitaire (CHU) de Tlemcen et aussi de caractériser ces biofilms mixtes en étudiant la cinétique de leur formation sur un support abiotique.

Première partie

Synthèse bibliographique

Chapitre 1 : Hémodialyse

1. Définition de l'hémodialyse

L'hémodialyse est une technique d'épuration du sang extra-corporellement. Lors d'une séance d'hémodialyse, le sang du malade est mis en contact avec une solution appelée dialysat à travers une membrane (le dialyseur) déposée sur un générateur (**Canaud, 2009**).

Le rein artificiel est composé d'un dialyseur dans lequel s'effectue l'échange, du dialysat et d'une circulation sanguine extracorporelle. Les séances de dialyse sont assurées par un appareil « le générateur d'hémodialyse » [(**Canaud, 2009**) ; (**Monardo et al., 2021**)].

2. Historique de dialyse

En 1854, Graham a posé le nom de "dialyse" sur un phénomène qu'il a étudié. Le premier essai de dialyse sur les animaux vivant été en 1913 par une équipe Américaine (**Abel, Rowntree et Turner, 1913**).

En 1925, l'Allemand **Georg Hass**, s'adonne au premier essai thérapeutique sur un jeune patient urémique avec le rein artificiel. La membrane de dialyse utilisée est composée d'une série d'ampoules en verre contenant des tubes de collodion. Ces tubes sont perméables aux constituants du sang, mais non aux protéines plasmatiques. Le dialysat utilisé était une solution saline et l'anticoagulant était l'hirudine [(**Pourriat et al., 2004**) ; (**Mineshima, 2015**)].

Le premier succès thérapeutique de l'hémodialyse auprès d'un patient est réalisé en 1945 par **Willem Kolff** aux Pays-Bas. Le dialyseur fabriqué est un réseau de tubes de cellophane, dans lequel les toxines urémiques sont éliminées depuis le sang par le phénomène de diffusion et convection [(**Maher et John, 1989**) ; (**Stewart, 2000**)].

Jusqu'à la fin des années 1970, le contrôle de composition chimique de l'eau de dialyse était la seule préoccupation. Le risque bactériologique n'était pas pris en considération [(**Mcgregor et al., 2000**) ; (**Mineshima, 2015**)].

3. Principe d'hémodialyse

Les particules toxiques accumulées dans le sang passent au dialysat par le phénomène de diffusion. Inversement, les ions s'équilibrent de part et d'autre du dialyseur en fonction de leur concentration sanguine initiale et la concentration du dialysat [(**Daugirdas, 2000**) ; (**Monardo et al., 2021**)].

En hémodialyse l'épuration du sang à travers le dialyseur est obtenue grâce à la circulation contre-courant du sang d'un côté et du dialysat de l'autre côté de la membrane (**Man et al., 2010**). La membrane semi perméable autorise le passage de l'eau, des électrolytes et des solutés de poids moléculaire inférieur à celui de l'albumine, mais non celui des protéines et des constituants du sang (globules rouges, globules blancs et plaquettes) (**Man et al., 2010**).

Pendant leur diffusion dans le dialysat, la taille des particules, détermine le taux de diffusion à travers la membrane. Plus la taille de la particule de corps dissous est grande, plus le taux de diffusion à travers la membrane est faible (**Diaz et al., 2013**)

4. Processus de purification de l'eau pour hémodialyse

La station du traitement d'eau pour la dialyse est composée de plusieurs pompes, filtres et tuyaux (**Figure 1**). L'osmose inverse est le processus du choix pour la purification de l'eau utilisée en hémodialyse. L'osmose inverse réduit efficacement les contaminants : au moins un facteur de 10 pour les contaminants inorganiques et par un facteur de 10^{-3} à 10^{-5} pour la charge bactérienne [(**Ward, 2005**) ; (**Agar, 2015**)].

De telles réductions sont habituellement suffisantes pour produire une eau répondant aux exigences recommandées. Cependant, les chloramines présentent une exception à cette règle générale. Les chloramines sont fortement toxiques aux dialysés et sont employées de plus en plus comme alternative du chlore dans l'eau de ville [(**Pontoriero et al., 2003**) ; (**Allard, 2004**)].

L'adsorption au charbon actif est la manière utilisée pour éliminer les chloramines dans l'eau. Pour cette raison, tous les systèmes de traitement d'eau de dialyse devraient inclure deux filtres à charbon actif reliés en série et placés avant l'unité d'osmose inverse [(**Pontoriero et al., 2003**) ; (**Payne et Curtis, 2021**)].

De temps en temps, le charbon n'assure pas l'élimination attendue des chloramines en raison de la nature de l'eau approvisionnée (taux élevés de matériel organique, utilisation du pH élevé ou l'utilisation des inhibiteurs de la corrosion) [(**Eaton et Pooler, 2009**) ; (**Payne et Curtis, 2021**)]. Dans telles circonstances, l'eau d'alimentation doit être traitée préalablement par des résines échangeuses d'ions (pour nettoyer les macromolécules organiques) ou l'injection d'acide pour ajuster le pH (**Coulliette et Arduino, 2013**). Le calcium et le magnésium peuvent être enlevés par l'osmoseur, mais ils peuvent encrasser les membranes d'osmose inverse et raccourcir leur vie. Ainsi, un adoucisseur pour enlever le calcium et le magnésium est installé. L'adoucisseur devrait être bien choisi afin d'éviter l'épuisement de l'eau pendant la dialyse (**Mouchet, 2000**).

L'eau : médicament de la dialyse

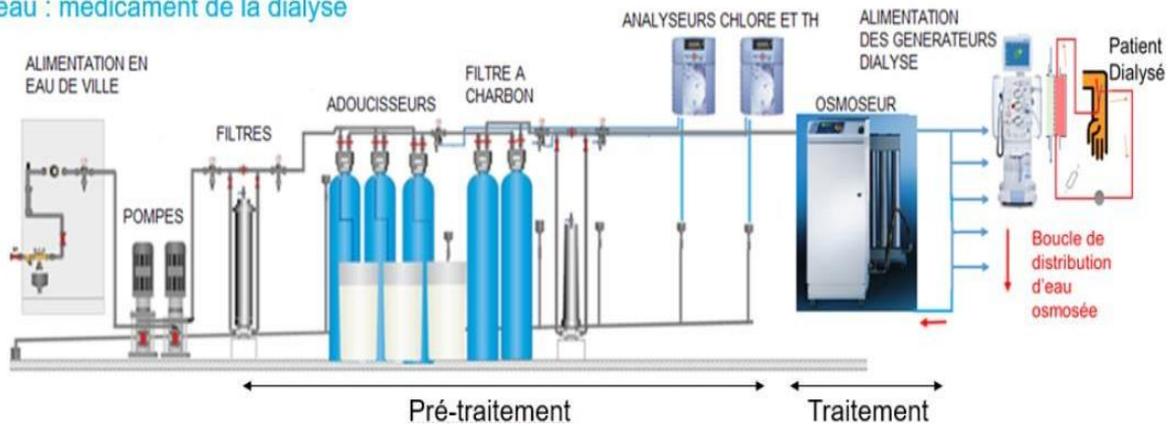


Figure 1 : Les principaux équipements du système de traitement d'eau en hémodialyse (Agnid et Habib, 2018).

L'autre prétraitement peut inclure un filtre de sédimentation pour enlever des solides en suspension et un filtre à particules pour enlever les particules qui peuvent endommager les pompes et les membranes d'unité d'osmose inverse. Tous les filtres doivent avoir des boîtiers opaques pour empêcher la croissance d'algues (Ahmad, 2005).

Le bon fonctionnement de l'osmoseur et du filtre au charbon actif est influencé par la température de l'eau. Une valve mélangeante d'eau chaude et froide devrait être installée à l'admission au système de traitement d'eau pour maintenir une température d'eau adéquate (Ahmed, 2005).

Une fois que l'eau répondant aux normes recommandées est produite, elle doit être distribuée à son point d'utilisation avec la pression exigée par l'équipement de dialyse et sans dégrader sa qualité. Le système de distribution de l'eau se compose habituellement d'un réservoir de stockage et d'une boucle de distribution, qui prend l'eau du réservoir à son point d'utilisation et renvoie l'eau non utilisée au réservoir. Bien que les réservoirs de stockage soient susceptibles d'être contaminés et difficilement désinfectés, ils offrent un approvisionnement stable de l'eau et aussi la sûreté de l'approvisionnement en eau si une interruption du système de traitement est faite au cours des séances de dialyse [(Pontoriero et al., 2003) ; (Bolasco, 2020)].

Si un réservoir de stockage est employé, il devrait n'être pas plus grand que nécessaire, avec un couvercle serré et un fond conique, s'écoule au plus bas point, et soit conçu pour une désinfection facile de toutes sa surface interne. La boucle de distribution est construite de matériaux inertes et conçue pour réduire la prolifération bactérienne au minimum (Hoenich et al., 2006).

La tuyauterie est généralement fabriquée par le chlorure de polyvinyle. D'autres matériaux, tels que le polyéthylène ou de fluorure polyvinylidène, peuvent être nécessaires si le système de distribution subit une désinfection à l'eau chaude ou à l'ozone [(Grynfogel, 2005) ; (Gaibor et al., 2019)]. La tuyauterie et d'autres installations ne doivent pas contenir le laiton, le cuivre, l'aluminium ou les pièces galvanisées parce qu'ils sont des métaux toxiques dans l'eau purifiée (Grynfogel, 2005). La boucle de distribution ne doit pas contenir des zones mortes (l'eau qui stagne) où les bactéries peuvent proliférer [(Pontoriero et al., 2003) ; (Hoenich et al., 2010)].

5. Standards pour la qualité de l'eau de dialyse

Un certain nombre de standards pour la qualité chimique et microbiologique sont proposés, les plus largement admis sont les recommandations américaines de l'association pour l'avancement de l'instrumentation médicale (AAMI) et ceux de la Pharmacopée Européenne (PE). Tous les deux établissent des taux maximum très restrictifs pour la contamination chimique, mais elles sont différentes en ce qui concerne la contamination microbienne.

Les recommandations d'AAMI permettent une limite supérieure de 200 UFC/mL pour la contamination microbienne et de 2 UI/mL pour les endotoxines. Ils établissent un taux de 50 UFC/mL pour la contamination bactérienne et de 1 UI/mL pour endotoxine, au-dessus desquelles les actions correctives devraient être effectuées, telles que le nettoyage et la désinfection (AAMI, 2000). Les recommandations de Pharmacopée Européenne établissent des limites plus restrictives : croissance bactérienne < 100 UFC/mL et endotoxines < 0.25 UI/mL (PE, 2000).

Le concept de l'eau d'ultra-pure a été créé et, défini en tant qu'une eau où la contamination microbienne de < 0.1 UFC/mL et concentration d'endotoxine < 0.03 UI/mL. Cependant, la nécessité de réduire au minimum les niveaux de la contamination bactérienne demeure toujours une question avec une large discussion et d'une certaine incertitude [(Tielemans et al., 2001) ; (Kawanishi et al., 2016) ; (Mineshima et al., 2019)]

Le niveau de pureté des liquides de dialyse dépend également du mode de dialyse appliqué. En matière de pureté de liquide de dialyse, "European Best Practice Guidelines" incite de suivre les recommandations du Pharmacopée Européenne, et souhaite une eau ultra-pure dans toutes les modalités de traitement, mais en particulier pour la dialyse de haut flux (European Best Practice Guidelines for Haemodialysis, 2000).

Par conséquent, il est important que les unités de dialyse soient organisées de façon à garantir une qualité de l'eau de dialyse maintenue dans les limites recommandées par les standards.

5.1 Contamination chimique

Plusieurs contaminants chimiques peuvent se retrouver dans l'eau de dialyse, certains sont peu toxiques et d'autres sont très toxiques. Le contrôle de ses concentrations dans les eaux de dialyse est indispensable. Les différents contaminants chimiques recherchés dans l'eau de dialyse avec leurs limites de concentration admises pour chaque substances sont représentés ci-dessous.

Tableau 1 : Les concentrations maximales des contaminants chimiques admises dans l'eau de dialyse [(AAMI, 2000) ; (PE, 2002) ; (journal officiel Algérien, 2002)].

Contaminant	Concentration maximale (mg/L = ppm)		
	AAMI	Pharmacopée Européenne 7.0	Norme Algérienne 2002
Substances incluses dans les fluides de dialyse :			
Calcium	2 (0,1 mEq/L)	2	2
Magnésium	4 (0,3 mEq/L)	2	1,2
Potassium	8 (0,2 mEq/L)	2	2
Sodium	70 (3.0 mEq/L)	50	5
Substances toxiques régulées par le Safe Drinking Water Act:			
Arsenic	0,005	-	-
Barium	0,01	-	-
Cadmium	0,001	-	-
Chrome	0,014	-	-
Plomb	0,005	-	-
Mercure	0,0002	0,001	0,004
Sélénium	0,09	-	-
Argent	0,005	-	-
Autres substances identifiées comme toxiques en dialyse :			
Aluminium	0,01	0,01	0,01
Ammonium	-	0,2	0,2
Chloramines	0,10	-	-
Chlorures libres	0,5	50	50
Chlore total disponible	-	0,1	-
Cuivre	0,1	-	-
Fluorures	0,2	0,2	0,5
Nitrate	2,0	2,0	0,2
Sulfate	100	50	5
Zinc	0,1	0,1	0,05
Métaux lourds	-	0,1	-

5.2 Contamination microbienne

L'eau utilisée pour la préparation de fluides de dialyse n'est pas stérile. Les micro-organismes présents doivent être gardés sous contrôle, pour empêcher la prolifération bactérienne et limiter la formation de biofilm [(Gomila et al., 2006) ; (Humudat et Al-Naseri, 2020)].

Les bactéries à Gram négatif (source d'endotoxines) sont très répandues dans l'eau de dialyse. Cependant, les bactéries à Gram positif sont moins fréquemment identifiées (Humudat et Al-Naseri, 2020). Le **Tableau 2** ci-dessous présente les genres bactériens les plus retrouvés dans les eaux de dialyse.

Tableau 2 : Les genres microbiens les plus retrouvés dans les eaux de dialyse [(Morin, 2000) ; (Alter et al., 2004) ; (Gomila et al., 2006)].

Bacilles à Gram -	Levures et moisissures	Autres
<i>Pseudomonas</i>	<i>Candida</i>	<i>Mycobacterium</i>
<i>Flavobacterium</i>	<i>Rhodoturula</i>	<i>Staphylococcus</i>
<i>Acinetobacter</i>	<i>Cryptococcus</i>	<i>Bacillus</i>
<i>Aeromonas</i>	<i>Aspergillus</i>	
<i>Alcaligenes</i>	<i>Streptomyces</i>	
<i>Burkholderia</i>	<i>Cladosporium</i>	
<i>Enterobacter</i>	<i>Penicillium</i>	
<i>Moraxella</i>	<i>Phialemonium</i>	
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>Fusarium</i>	
<i>Sphingomonas</i>	<i>Acremonium</i>	
<i>Variovax</i>		
<i>Afipia</i>		
<i>Achromobacter</i>		
<i>Agrobacterium</i>		
<i>Ralstonia</i>		

Chapitre 2 : Biofilm et hémodialyse

Quand le nombre de bactéries devient trop élevé, les micro-organismes viables peuvent changer leurs modes de vie. Elles passent d'un mode planctonique (flotter librement dans l'eau) à un style de vie sessile (attacher sur un support) [(Costerton, 1999) ; (Cooper et Okhiria, 2006)]. Dans ce cas les biofilms peuvent se former dans le circuit des fluides de dialyse, qui sont habituellement les membranes de l'osmose inverse, les canalisations de distribution ou des tuyaux et des filtres de générateur de dialyse [(Wong et al., 2015) ; (Coenye et al., 2020)].

1. Définition du biofilm

Un biofilm est une communauté de différents micro-organismes qui se caractérise par des cellules fixées les unes aux autres, l'ensemble ainsi formé étant lui-même fixé à une surface, dans un milieu humide ou aquatique [(Hall-Stoodley et al., 2012) ; (Römling et al., 2014)].

Les micro-organismes secrètent une matrice exo-polymérique appelée classiquement EPS, la sécrétion de cette matrice implique les systèmes « Quorum Sensing » [(Fuqua et Greenberg, 2002) ; (Tremblay et al., 2014)].

Le mode biofilm procure aux bactéries un certain nombre d'avantages dont : une bonne cohésion et adhésion aux surfaces, absorption des nutriments et produits microbiens secondaires, une meilleure protection contre les modifications environnementales (Hall-Stoodley et al., 2012). L'ensemble de micro-organismes et les exo-polymères forment une couche protectrice visqueuse assurant une résistance aux méthodes de désinfection chimiques, physiques et parfois de détachement mécanique (Tremblay et al., 2014).

2. Etapes de formation du biofilm

De nombreuses études génétiques réalisées sur les biofilms, ainsi leurs observations directes par microscopie, ont conduit à un modèle de développement en cinq étapes (Figure 2).



Figure 2 : Etapes de formation de biofilm (Filloux et Vallet, 2003).

2.1 Adhésion réversible

Après un conditionnement très rapide de la surface, les bactéries se déplacent dans le milieu liquide par gravité, par force du flux, et/ou par les mouvements de leurs flagelles. Lorsque les bactéries sont au voisinage d'une surface, des forces d'attraction physico-chimiques interviennent pour donner des interactions réversibles avec la surface [(Sauer et al., 2002) ; (Caiazza et O'Toole, 2004) ; (Schilcher et Horswill, 2020)].

2.2 Adhésion irréversible

Dans un second temps, les cellules se divisent, le nombre de bactéries associées aux surfaces augmente et l'adhésion devient irréversible. Cette transition vers une adhésion irréversible s'accompagne d'une profonde modification du profil génétique. Les bactéries forment alors des amas à la surface en produisant des polysaccharides extracellulaires [(Beloin et al., 2004); (Ren et al., 2004) ; (Renner et Weibel, 2011) ; (Schilcher et Horswill., 2020)].

2.3 Formation des micro-colonies

La troisième étape est caractérisée par la formation de micro-colonies composées de bactéries initiales en division et de bactéries qui s'attachent sur le biofilm en formation (Chmielewski et Frank, 2003).

2.4 Maturation

Le stade de maturation correspond au développement des micro-colonies et à la structuration du biofilm, ce stade se caractérise par une croissance exponentielle, se traduisant par une augmentation importante de son épaisseur aboutissant à la formation d'un film hétérogène tridimensionnel [(Davey et O'Toole, 2000) ; (Sauer et al., 2002)].

Les micro-colonies se développent en piliers d'épaisseur variable au sein desquels les cellules sont englobées dans la matrice extracellulaire. Les espaces séparant les micro-colonies deviennent des canaux, à l'intérieur desquels les fluides nutritifs peuvent circuler.

2.5 Dispersion du biofilm

Certaines bactéries peuvent se détacher du biofilm mature et rentrer dans la phase de dissémination. Cette dernière étape permet la colonisation de nouvelles surfaces. Le détachement de cellules du biofilm intervient lorsque les conditions environnementales deviennent défavorables : limitation en oxygène dans des biofilms épais, diminution de la concentration ou modification de la nature des nutriments disponibles (Sauer et al., 2004). Les bactéries peuvent alors migrer afin de trouver un environnement plus favorable pour leurs développements (Coenye et al., 2020).

3. Sites du développement du biofilm dans le circuit de fluide d'hémodialyse

Toutes les surfaces des voies d'hémodialyse sont sensibles à l'invasion de biofilms. L'importance et la vitesse de croissance du biofilm dépendront de trois facteurs principaux : les types de matériaux, la conception du système de distribution (y compris les débits et les zones mortes) et la fréquence et l'efficacité des traitements de désinfection [(**Man et al., 1998**) ; (**Capelli et al., 2000**) ; (**Smeets et al., 2003**) ; (**Anversa et al., 2022**)].

Les conduites d'eau potable alimentant les centres de dialyse sont colonisées par des biofilms. Ces micro-organismes colonisent rapidement le système de traitement de l'eau avec des cellules adhérentes. Certains endroits précis du réseau sont plus sensibles à la contamination que d'autres : membranes et résines, coudes tranchants, joints rugueux, les réservoirs de stockage et les zones mortes [(**Smeets et al., 2003**) ; (**Anversa et al., 2022**)]. Mais, les membranes et les résines demeurent, les sites les plus prolifiques à la croissance de biofilm et donc l'utilisation de l'irradiation par rayons UV, pour réduire la charge biologique au cours du prétraitement devient incontournables [(**Lima et al., 2005**) ; (**Borges et al., 2007**)].

La boucle de distribution et les machines de dialyse ne sont pas épargnées. Pour cette raison, il est conseillé que les systèmes de dialyse utilisent des matériaux minimisant au maximum la colonisation et aussi doivent être faciles à traiter [(**Man et al., 1998**) ; (**García et Rodríguez-Benítez, 2000**) ; (**Cappelli et al., 2003**)].

Un autre endroit privilégié pour la croissance de biofilm est la connexion entre la boucle de distribution et les machines de dialyse. Ce raccord représente la partie du système la plus contaminée. En général, c'est une section de 1 à 3 m de tubes en PVC qui n'est que rarement ou jamais désinfectée (**Smeets et al., 2003**).

Similaire au système de traitement d'eau, les machines de dialyse sont également colonisées par les biofilms. Les composants les plus sensibles comprennent les sondes de détection, les connexions, les pompes. Le composant principal de la machine de dialyse est un tube en silicone, et il a été démontré à plusieurs reprises que ce tube contient des biofilms microbiens (**Marion-Ferey et al., 2003**).

Ce matériau a été choisi en raison de sa surface relativement lisse, mais lorsqu'on l'examine à l'échelle microscopique, ce matériau présente une surface rainurée et irrégulière, facilitant l'adhésion des bactéries. Des biofilms contenant jusqu'à 10^6 UFC/cm² et 10 UI/cm² ont été trouvés sur des tubes en silicone de machine de dialyse [(**Phillips et al., 1994**) ; (**Man et al., 1998**) ; (**Marion-Ferey et al., 2003**)].

4. Conséquences des biofilms en hémodialyse

L'infection est la cause majeure de morbi-mortalité chez les patients en l'hémodialyse, représentant 12 à 38% de la mortalité de ces patients (**Roth et Jarvis, 2000**). Certains micro-organismes trouvés dans les fluides d'hémodialyse ont le potentiel de causer des infections nosocomiales, et donc représentent un risque pour la santé du patient.

Les genres suivants ont été décrits comme agents responsables de bactériémie pendant l'hémodialyse chronique : *Acinetobacter*, *Afipia*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Candida*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, et *Ralstonia* [(**Roth et Jarvis, 2000**) ; (**Alter et al., 2004**)] et *Staphylococcus aureus* (**Chaudry et al., 2019**).

Les composés bactériens représentent un deuxième risque très important dans les liquides de dialyse. Les plus dangereuses de ces substances sont appelées des pyrogènes ou des substances inductrices de cytokines. Ces substances sont libérées par les bactéries après lyse des cellules mortes [(**Girndt et al., 1995**) ; (**Sundaram et al., 1997**) ; (**Griet et al., 2012**)].

Beaucoup de ces composés ont le potentiel de diffuser à travers la membrane de dialyse en raison de leur taille ; l'importance du transfert dépend du type de composé et du dialyseur (**Weber et al., 2004**). Le groupe de pyrogènes le plus connu est celui des lipopolysaccharides (LPS) de bactéries à Gram négatives, également appelées endotoxines (**Glorious et al., 2012**).

Ces composés sont chimiquement très stables. Le seul traitement éprouvé pour la destruction des endotoxines est le chauffage pendant 4 h à des températures supérieures à 180°C. Une complication supplémentaire pour les systèmes d'hémodialyse est l'affinité du LPS pour les surfaces où ils se fixent fortement par liaisons hydrophobes (**Bamba et al., 1996**).

Pendant longtemps, les endotoxines ont été considérées comme les seuls composés pyrogènes. Cependant, l'amélioration de la détection de la pyrogénicité a conduit à mettre en évidence de nombreuses autres molécules pyrogènes. Ces produits sont : peptidoglycanes, exotoxines, ADN bactérien et les muramyl dipeptides [(**Sparwasser, 1997**) ; (**Shinoda, 2004**)].

5. La désinfection

Afin d'assurer la même qualité d'eau de dialyse, il est nécessaire de procéder une désinfection régulière de l'ensemble du système de traitement d'eau. Ceci permet d'empêcher la formation de biofilms ou de limiter leurs expansions s'ils sont déjà présents [(Isakozawa *et al.*, 2016) ; (Payne et Curtis, 2021)].

Il existe deux types de désinfection (Humudat *et al.*, 2020):

Physiques : Chaleur, lumière UV

Chimique : Oxydes, soude, ozone, chloration....

Certains centres de dialyse possèdent un système de désinfection par chloration pour réduire un nombre important de microorganismes pathogènes. Les produits utilisés pour la désinfection chimique sont présentés dans le **Tableau 3**. Les produits les plus utilisés sont : l'hypochlorite de sodium, l'acide per-acétique et le dichloro-iso-cyanurate de sodium.

Tableau 3 : Désinfectants utilisés dans le système de dialyse.
[(Marion-Ferey *et al.*, 2003) ; (Holmes *et al.*, 2004)].

	Effet biocide	Effet détartrant	Effet nettoyant
Acide Peracétique (CH_3COOOH)	+++	+	+
Hypochlorite de Sodium (HClO)	+++	0	++
Eau chaude à ($85 - 90^\circ\text{C}$)	+++	0	0
Acide Citrique $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ à $85 - 95^\circ\text{C}$	+++	+++	+
Acide Glycolique ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_3$) à $85 - 95^\circ\text{C}$	+++	++	+
Vapeur d'eau (125°C , 1.5 atm)	+++	0	0
Peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)	++	0	+
Chlorine dioxyde (ClO_2)	+++	0	++
Aldehydes (R-CHO)	+++	0	0
Acide Acétique (CH_3COOH)	0	++	+
Acide Lactique ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$)	0	+++	+
Acide Oxalique ($\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_5$)	0	++	+

+++ efficacité haute ; ++ efficacité intermédiaire ; + efficacité faible ; 0 aucune efficacité

Chapitre 3 : Biofilm mixtes

1. Définition

La grande majorité des habitats environnementaux sont colonisés par des biofilms de multiples espèces bactériennes, des champignons, des algues et des protozoaires. Ces dernières années, il y a eu progressivement un changement d'orientation pour étudier la complexité et les interactions dans les biofilms mixtes (**Zengler et Palsson, 2012**).

L'importance des interactions inter-espèces a été d'abord décrite en détail pour les bactéries de la cavité buccale (**Kolenbrander et al., 2010**). D'autres modèles ont été révélés plus tard dans des biofilms bactériens isolés de divers environnements, notamment le sol, la mer, l'eau et les habitats artificiels tels que le système distribution d'eau potable et coques de bateaux [(**Stewart, 2002**) ; (**Burmølle et al., 2006**) ; (**Hangler et al., 2009**) ; (**Schwering et al., 2013**)].

Les principaux résultats d'études montrent que de nombreuses interactions complexes et spécifiques façonnent et influencent les biofilms multi-espèces, cette synergie est souvent observée quant à la biomasse des biofilms. De plus, ces interactions provoquent souvent une modification du biofilm, améliorant une fonction ou un produit [(**Hangler et al., 2009**) ; (**Schwering et al., 2013**) ; (**Thet et al., 2018**)].

Ceci est une indication claire qu'un biofilm mixte est différent et plus complexe qu'un biofilm mono-espèce. L'extrapolation directe des résultats sur les biofilms mono-espèces à des biofilms naturels complexes sont donc imprécis et parfois trompeurs [(**Kolenbrander et al., 2010**) ; (**Zengler et Palsson, 2012**)].

Il est maintenant le temps de se concentrer sur l'étude du biofilm multi-espèces en une seule unité afin de comprendre les conséquences des interactions entre espèces bactériennes lorsqu'elles résident dans un même biofilm.

Les études de communautés bactériennes complexes ne sont pas triviales, surtout si l'on souhaite les étudier globalement (ensemble et non séparément). Cependant, les avancées récentes de la technologie donnent des solutions améliorées avec des coûts d'exploitation réduits. Les séquenceurs génétiques de nouvelle génération, la spectrométrie de masse et la microscopie à haute résolution, ont généré la quantité de données requises pour telles études (**Rosenthal et al., 2018**).

2. Conséquences de biofilm mixtes

2.1 L'effet protecteur des biofilms multi-espèces

Les biofilms bactériens sont mieux protégés contre le stress que les cellules planctoniques à croissance exponentielle (Jefferson, 2004). Les effets protecteurs vis-à-vis des agents antimicrobiens, l'action du système immunitaire et le broutage des protozoaires ont été démontré à plusieurs reprises dans divers biofilms [(Fux et al., 2005) ;(Matz et Kjelleberg, 2005)].

La protection de biofilm s'explique par plusieurs facteurs, souvent fonctionnelle, y compris la structure modifiée, le taux de diffusion réduit des composés dans la matrice exo-polymérique, le nouveau mode d'expression génétique et le faible taux de croissance des cellules dans le biofilm (Mah et O'Toole, 2001). De plus, la structure et la composition de biofilm (jusqu'à 97% d'eau) protègent les cellules contre de la dessiccation et d'autres facteurs de stress environnementaux [(Flemming et Wingender, 2010) ; (Wickramasinghe et al., 2020)].

Les effets protecteurs des biofilms s'améliorent de manière synergétique lorsque plusieurs espèces sont présentes. Cela a été montré en utilisant quatre isolats de bactéries marines, lorsqu'elles sont co-cultivées, la biomasse de biofilm est augmentée d'un pourcentage de 167% en comparaison avec les biomasses de leurs biofilms mono-espèces (Burmølle et al., 2006).

Les cellules bactériennes du biofilm multi-espèces se sont avérées plus résistant au stress chimique (tétracycline et peroxyde d'hydrogène). Aussi, il a été démontré que ces biofilms mixtes isolés d'eau potable résistaient à une concentration plus élevée au chlore et supérieur à celle des cultures planctoniques et biofilms mono-espèces (Schwering et al., 2013).

Certaines études ont démontré des cas où la résistance globale est augmentée lorsque plusieurs bactéries ou espèces fongiques coexistent dans les biofilms. Ces protecteurs synergétiques sont très pertinents dans de nombreux aspects [(Harriott et Noverr, 2009) ;(Shirliff et al., 2009) ;(Lee et al., 2013)]. Néanmoins, l'évaluation de cette résistance doit être prise en compte dans le cas des antibiothérapies et les procédés de nettoyage et désinfection [(Harriott et Noverr, 2009) ; (Peters et al., 2010)].

2.2 Booster la virulence

Les interactions multi-espèces dans les infections chroniques n'ont pas seulement un impact sur le traitement, mais la gravité de l'infection peut également s'accroître. Une étude a démontré in vivo que la cicatrisation des plaies lorsqu'elles sont infectées par un biofilm à deux espèces de *S. aureus* et *P. aeruginosa* était retardée. Les plaies co-inoculées avec ces deux bactéries guéri

plus lentement que les plaies non inoculées et ceux contaminés par qu'une seule espèce. Cela a été attribué suite à l'induction dépendante de certains facteurs de virulence de *S. aureus* par l'espèce *P. aeruginosa* [(Pastar et al., 2013) ; (Serra et al., 2015)].

Une autre étude a démontré que l'augmentation de la virulence peut être induite par des souches à Gram positif, car la présence du peptidoglycane dans le milieu augmente la virulence de *P. aeruginosa* (Korgaonkar et al., 2013).

2.3 Dégradation des composés organiques et polluants

Les biofilms sont très utilisés pour la dégradation de divers types de composés. Les enzymes impliquées dans le processus de dégradation peuvent être retenues dans la matrice exopolymérique à proximité des cellules productrices. Ceci, augmente les chances que ces enzymes et ces produits ne diffusent pas dans le milieu et seront réutilisés d'autres fois (Jassn et al., 2002). Il a été également prouvé que dans les stations d'épuration des eaux usées, les biofilms dégradent efficacement les matières organiques et les composés inorganiques et les polluants.

De plus, la structure de la matrice exopolymériques du biofilm optimise l'absorption et la disponibilité des composés, ainsi permettant la coexistence de bactéries différentes assurant une dégradation plus efficace [(Ehlers et Turner, 2012) ; (Pastorella et al., 2012) ; (Mangwani et al., 2016)].

En général, la diversité accrue et les fonctionnalités des biofilms multi-espèces améliorent le potentiel de biodégradation. Ceci a été rapporté dans plusieurs études, y compris la dégradation des hydrocarbures polycycliques où la dégradation était plus efficacement réalisée par des biofilms mixtes [(Stach et Burns, 2002) ; (Wang et al., 2015)].

Deuxième partie

Matériel et méthodes

1. Cadre de l'étude

Cette étude a été menée dans une unité d'hémodialyse au CHU Tlemcen. Le service effectue environ 1000 séances d'hémodialyse mensuelles en trois groupes par jour pour les patients en phase terminale souffrants de l'insuffisance rénale.

Le système de traitement d'eau est une unité intégrée dans le service qui comprend le robinet d'eau prétraitée avec un système de filtration, un adoucisseur d'eau, et un filtre à charbon actif suivi d'une purification finale avec le procédé d'osmose inverse. L'eau traitée est distribuée directement aux machines de dialyse (pas de réservoir pour l'eau osmosée).

Après chaque séance d'hémodialyse, les machines sont rincées et désinfectées selon des protocoles appliqués par le service.

2. Procédure d'échantillonnage de l'eau.

Sur une période de cinq mois allant de janvier 2016 à mai 2016 et dans des conditions d'asepsie, les échantillons d'eau (100 mL) ont été collectés à partir de deux sites : boucle de distribution d'eau osmosée et à l'entrée des générateurs de dialyse dans le service d'hémodialyse du CHU de Tlemcen (**Figure 3**).

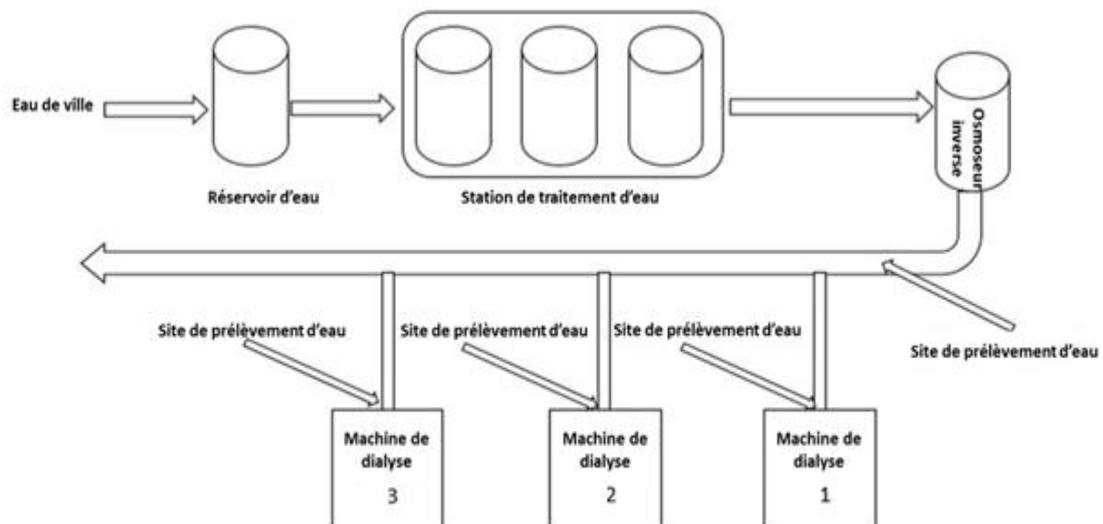


Figure 3 : Sites de prélèvements.

3. Dénombrements

Les échantillons d'eau sont mis dans des bouteilles stériles en verre et acheminés au laboratoire de microbiologie appliquée à l'agroalimentaire, au biomédical et à l'environnement (LAMAABE) pour être tout de suite analysés.

Selon les recommandations de la pharmacopée européenne, les échantillons d'eau ont été filtrés sur des membranes d'acétate de cellulose (millipore de taille 0.45 μm), celles-ci sont placées ensuite sur des boîtes de Pétri contenant la gélose de **Reasoner** (R2A) (**Figure 4**). Ce milieu minimum est recommandé pour limiter le stress bactérien provoqué lors du transfert des bactéries à partir d'un milieu oligotrophe (**Reasoner, 2004**).

Parallèlement 0.2mL de chaque échantillon est ensemencé en surface sur une gélose R2A et sur gélose nutritive (pour isolement et purification).

Les unités formant des colonies (UFC) ont été comptées après une période d'incubation de 5 jours à 22°C.

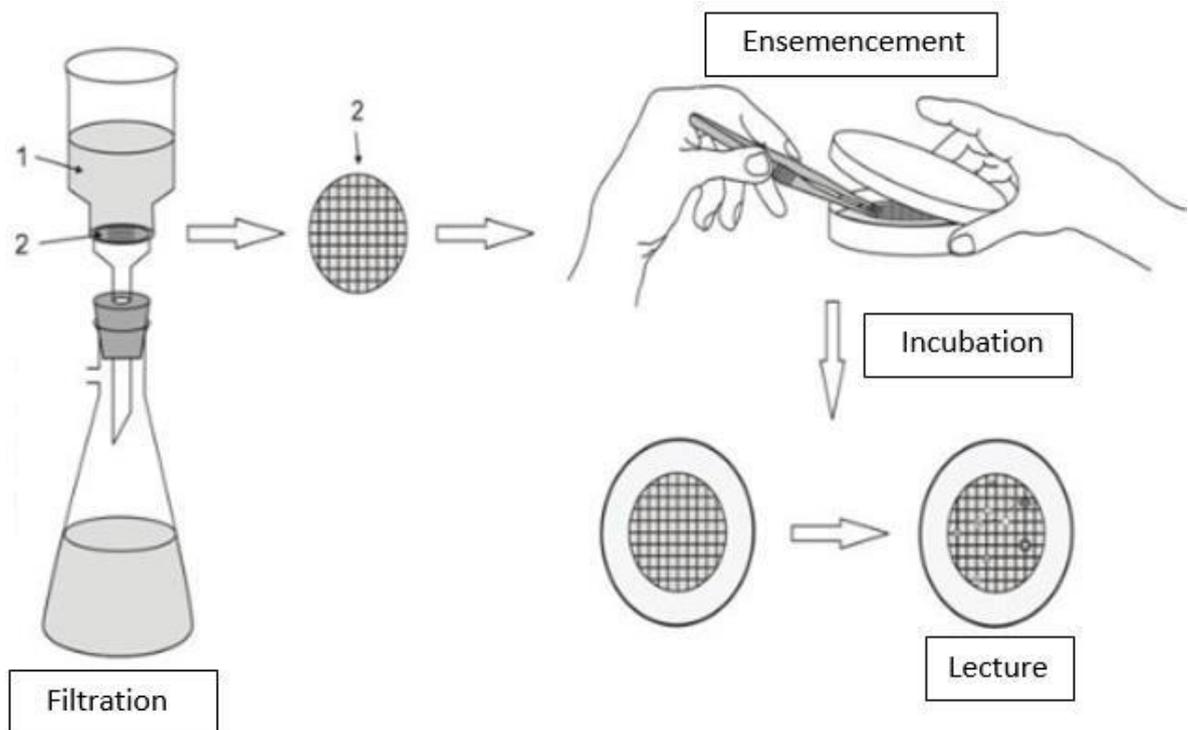


Figure 4 : Technique de dénombrement par filtration.

4. Identification des isolats

Après isolement et purification des différents types de colonies poussées sur gélose R2A. Un examen microscopique est effectué pour mettre en évidence la forme des bactéries, le mode de regroupement et le type de Gram. Les isolats sont ensuite classifiés sur la base des tests suivants : catalase, oxydase et le test coagulase pour les genres *Staphylococcus*.

L'identification biochimique des espèces isolées est réalisée par la galerie Api 20E pour les Gram négatif et *Bacillus* et la galerie Staph ID 32 pour les *Staphylococcus*.

5. Traitement des sections de tubulures d'eau reliant la boucle aux machines de dialyse

5-1 Dénombrement de la flore adhérente

L'évaluation des biofilms bactériens formés à l'intérieur des tuyaux (PVC) a été étudiée sur des segments de 1cm² de tubulures d'alimentation d'eau reliant les générateurs de dialyse avec la boucle de distribution. Ces segments sont mis dans des pots stériles et transportés aseptiquement au laboratoire pour être analysé.

Les échantillons ont été préparés dans des conditions aseptiques, les surfaces extérieures des tubulures étaient minutieusement désinfectées avec une solution d'alcool à 70%.

Le détachement des bactéries sessiles est réalisé selon la technique validée en 2003 par Smeeth et ses collaborateurs où ils étudient le détachement du biofilm dans des sections courtes des tuyaux neufs et stériles puis contaminés par des souches bactériennes connues (**Smeeth et al., 2003**).

Le détachement de biofilm est assuré par un fort écouvillonnage de la surface interne du segment de ce dernier (tuyau). L'écouvillon est mis tout de suite après dans un tube contenant 10 mL d'eau physiologique stérile puis vortexer pendant 2 minutes afin de libérer au maximum les bactéries attachées à l'écouvillon.

Après incubation, les colonies sont dénombrées et les résultats ont été exprimés en logarithme d'unités formant des colonies par centimètre carré (log UFC/cm²) (**Figure 5**).

Les colonies présentant des différences morphologiques étaient isolées et purifiées. L'identification des souches est basée sur la coloration de Gram et sur les caractères biochimiques (galerie miniaturisée d'identification API). Toutes les expériences ont été effectuées en double et les valeurs moyennes ont été calculées.

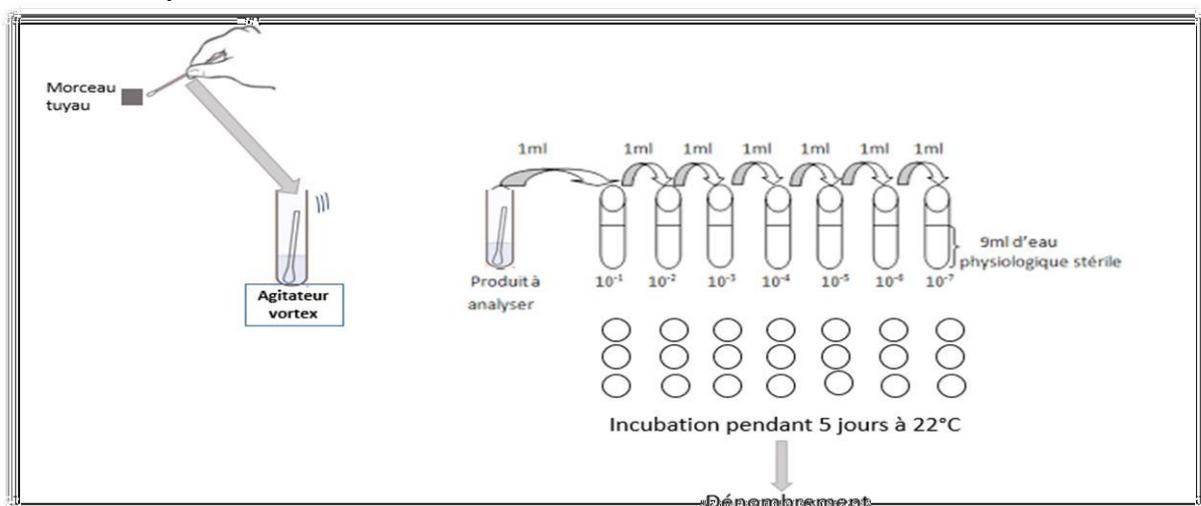


Figure 5 : Technique de dénombrement des bactéries adhérentes sur tubulures de machines de dialyse.

5.2 Evaluation des souches isolées à former un biofilm

La capacité de formation de biofilm est testée par la méthode de cristal violet sur microplaque à 96 puits. Cette technique est réalisée selon les recommandations de **Christensen et al., 1985**). Les différentes souches isolées ont été incubées durant une nuit dans le milieu BHIB à 37 degrés Celsius.

Chaque culture jeune est ajustée à 10^8 UFC/mL puis diluées à 1/100. Un volume de 200 microlitre de cette dilution est ajouté dans chaque puits de la microplaque. Pour chaque souche 3 puits sontensemencés et incubés à une température de 37°C pendant 24 heures.

Les puits des microplaques sont rincés 3 fois avec de l'eau distillée stérile. Puis séchés et colorés avec 200µL de cristal violet 5% pendant 30 minutes. Après l'étape de coloration on effectue un lavage abondant (5 fois) avec de l'eau distillée stérile afin d'éliminer les cellules faiblement adhérentes. Le biofilm formé incorpore le cristal violet et pour le solubiliser et mesurer cette quantité de colorant, 200µL d'éthanol 95% est ajoutés dans chaque puits et on mesure la densité optique 570 nm (**Figure 6**).

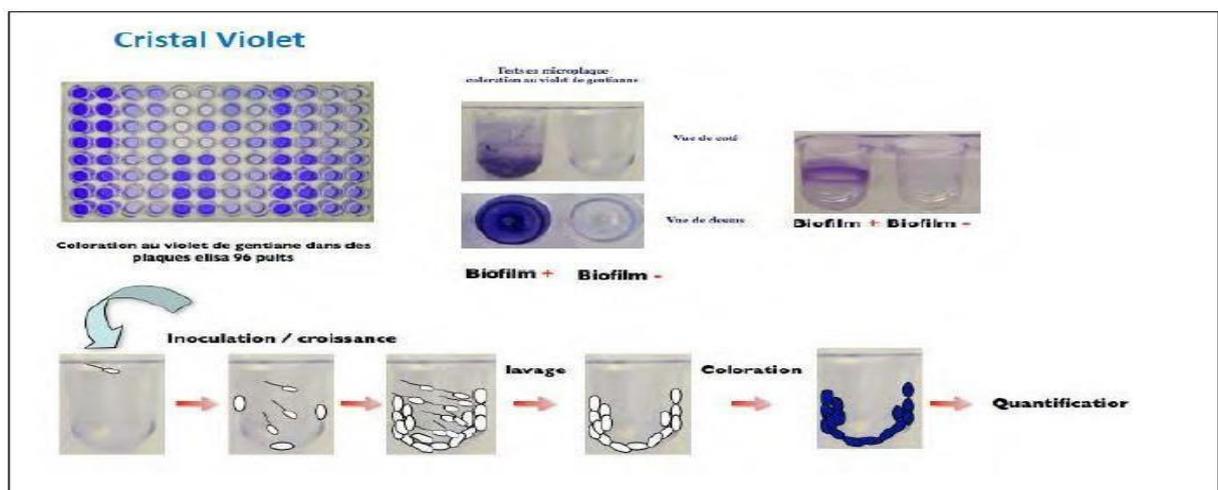


Figure 6 : Capacité de formation de biofilm sur microplaque (**Filloux et Vallet, 2003**).

6. Etude de résistance aux désinfectants

L'unité de dialyse du CHU de Tlemcen essaye bien que mal de nettoyer par un désinfectant à base de l'acide peracétique et de peroxyde d'hydrogène. Dans le but de savoir si celui-ci agit sur les bactéries retrouvées et bonnes formatrices de biofilm, la méthode de microplaque a été utilisée afin de déterminer la CMI du désinfectant sur les souches isolées.

Les souches testées sontensemencées sur le milieu BHIB et incubées pendant 18h à 37°C afin d'obtenir une culture jeune. Les suspensions sur lesquelles on étudie la résistance aux désinfectants sont obtenues par l'ajout de 200 µL de culture jeune à 1,8 mL de BHIB. Ce mélange est vortexé afin d'obtenir une suspension homogène (**Rouillon et al., 2006**).

Pour l'étude de la résistance aux désinfectants, les suspensions obtenues sont inoculées dans des microplaques selon la méthode de (**Rouillon et al., 2006**). Cette technique repose sur l'ajout de 20 µL des dilutions de désinfectants préparés au 180 µL de la suspension bactérienne étudiée. Les microplaques préparées sont incubées à 37°C pendant 24h.

La lecture de la CMI désinfectant est fondée sur l'appréciation visuelle sachant que la CMI correspond à la concentration du désinfectant où la croissance bactérienne est inhibée dans cette cupule.

7. Microscopie électronique à balayage

Les biofilms sont formés sur des morceaux de tuyaux neufs. Après incubation pendant 24h, les biofilms formés sont lavés avec un tampon phosphate et fixés par le glutaraldehyde 2%. Les biofilms formés sont déshydratés progressivement par trempages successifs dans des solutions alcooliques 20%, 40%, 60%, 80%, 99%.

Les biofilms déshydratés sont analysés par le microscope électronique à balayage HITACHI TM1000 au laboratoire du physique de l'université de Tlemcen.

8. Étude de biofilms mixtes

A travers les techniques de l'évaluation des biofilms formés à l'intérieur des tuyaux, les bactéries ne sont jamais retrouvées seules et isolées mais toujours associées à d'autres espèces, ce qui nous a emmenés à vouloir étudier cet état de fait et de pouvoir comprendre ce biofilm mixte.

Les bactéries étudiées ont été cultivées durant une nuit sur le milieu BHIB à 37°C. Les bouillons de cultures sont ajustés à une densité optique de 0,5 Mc Farland afin d'avoir des charges microbiennes égales puis diluées à un centième (1/100).

Ceci et dans le but d'avoir des charges initiales faibles de bactéries étudiées afin d'empêcher l'épuisement rapide du milieu de culture (la bactérie pousse dans des conditions normales) et aussi pour la raison de minimiser la compétition inter-espèces en suspension dans les premières heures d'incubation après le mélange.

On a étudié l'évolution des biofilms mono espèces (chaque espèce toute seule) et des biofilms mixtes (mélange de deux espèces). Dans les biofilms mixtes, les bactéries à Gram négatif sélectionnées ont été mélangées séparément avec le même volume de bactérie à Gram positif. Les microplaques ont été ensemencées par 200 µL de ces mélanges de bactéries et incubées à 37°C pendant différentes périodes à savoir 24, 48, 72 et 96 heures.

Dans le but de suivre l'évolution des biofilms étudiés (mono espèce et mixtes) au cours du temps, chaque jour des dénombrements de bactéries attachées ont été effectués et pour les microplaques restant pour une durée d'incubation plus longue, les puits ont été lavés trois fois avec 200 µL d'eau distillée stérile et 200 µL de BHIB sont ajoutés dans chaque puits.

Avec des écouvillons stériles, on racle les biofilms formés sur les surfaces internes des puits de manière rotatif, 5 fois dans le sens des aiguilles de la montre et 5 fois dans le sens contraire. Ces écouvillons ont été transférés dans 10 millilitres d'eau physiologique stérile et vortexer pour libérer au maximum les bactéries attachées aux écouvillons puis une série de dilutions a été effectuée 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} et 10^{-4} .

Un volume de 100 µL de chaque dilution est ensemencé dans deux milieux de cultures différentes. Le Milieu Mc Conkey et le milieu Chapman. Ces deux milieux ont été choisis pour cultiver séparément les espèces bactériennes à savoir le milieu Mc Conkey pour les bactéries à Gram négatif et le milieu Chapman pour les staphylocoques.

Dans cette étude, l'évolution des biofilms bactériennes est aussi suivie par la technique de cristal violet en mesurant la densité optique des biofilms formés au cours du temps.

Le suivi de la densité optique des cultures planctoniques est aussi assuré au cours du temps afin de comprendre le comportement de ces bactéries (mono-espèce et mixtes) dans l'état planctonique.

3^{eme} Partie

Résultats et discussion

De nombreux patients dialysés peuvent être traités par transplantation rénale mais malheureusement, elles ne sont pas courantes au CHU de Tlemcen (Algérie). Chaque semaine, les patients sont exposés à environ 400 et 600 litres d'eau utilisée pour la production de liquide de dialyse, avec une prédisposition accrue à la contamination (**Pisani et al., 2000; Hoenich et Levin, 2003**).

Des concentrations élevées de bactéries, y compris des fragments d'endotoxine, de peptidoglycanes et d'acide désoxyribonucléique bactériens, peuvent traverser les membranes à flux faible et élevé, stimuler la production de cytokines et déclencher des inflammations aiguës (**Oumokhtar et al., 2013**).

De même, divers micro-organismes peuvent se multiplier rapidement dans le système de traitement de l'eau d'un centre d'hémodialyse (**Gomila et al., 2006**). Si le niveau de contamination bactérienne dépasse alors les limites actuellement acceptées, il peut en résulter une septicémie ou une endo-toxémie causée par les bactéries à Gram négative (**Glorieux et al., 2012**).

1. Résultats de la qualité microbiologique de l'eau de dialyse

La qualité de l'eau de dialyse en amont de l'appareil de dialyse est essentielle, car cette eau est utilisée dans la préparation du dialysat. Celui-ci va interagir avec le sang du patient à travers la membrane de dialyse, pour cette raison de nombreux standards sont proposés afin d'établir la qualité microbiologique et chimique de l'eau de dialyse. Les plus largement connus sont les recommandations de l'Association pour l'Avancement de l'Instrumentation Médicale (AAMI 2004) et ceux de Pharmacopée Européenne (2011).

Les recommandations microbiologiques d'AAMI permettent une limite supérieure de 200 UFC/mL pour la contamination microbienne et de 2 UI/mL pour la contamination d'endotoxine de l'eau. L'AAMI oblige des actions correctives de désinfection et nettoyage au-delà de 50 UFC/mL pour bactéries et de 1 UI/mL pour endotoxines.

Les recommandations de la pharmacopée européenne établissent des limites plus restrictives où la contamination bactérienne doit être < 100 UFC/mL et endotoxines < 0.25 UI/mL (**PE, 2011**).

Durant 5 mois d'étude, vingt prélèvements d'eau ont été effectués à partir de la boucle de distribution à raison de 3 à 5 prélèvements par mois et 10 autres ont été effectués au niveau des générateurs juste à l'entrée de chaque machine de dialyse.

Selon le journal officiel de la république Algérienne qui stipule que le dénombrement de bactéries hétérotrophes dans l'eau est indispensable, car celle-ci entre dans la composition du

dialysat qui favorise la croissance de micro-organismes susceptibles de libérer de grandes quantités d'endotoxines. Tout de même ce journal ne précise pas les limites de contamination bactérienne admises (**journal officiel de la république Algérienne, 2002**).

Les résultats de dénombrement bactérien de l'eau prélevée à la boucle de distribution sont présentés dans la (**Figure 7**). Ils varient de 90 à 150 UFC/mL avec une moyenne de 118 UFC/mL.

Quant à la qualité de l'eau à l'entrée des différents générateurs de dialyse (entrée de machine de dialyse), celle-ci présentait des taux supérieurs à ceux trouvés dans l'eau de la boucle de distribution, avec une moyenne de 182 UFC/mL (**Figure 8**). Les machines M9, M5 et M10 présentaient respectivement des taux les plus élevés soit 220, 202, et 197 UFC/mL.

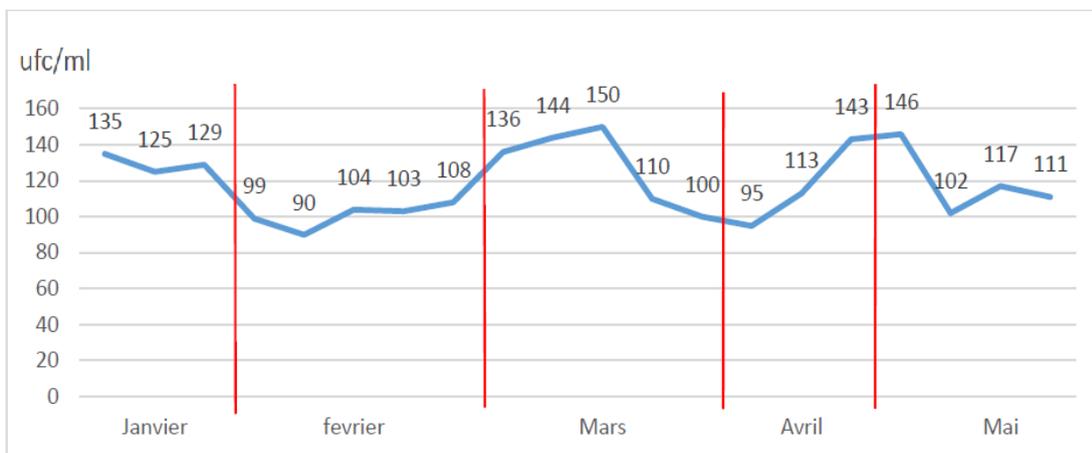


Figure 7 : Dénombrement bactérien de l'eau de dialyse prélevée de la boucle de distribution au cours de 5 mois.

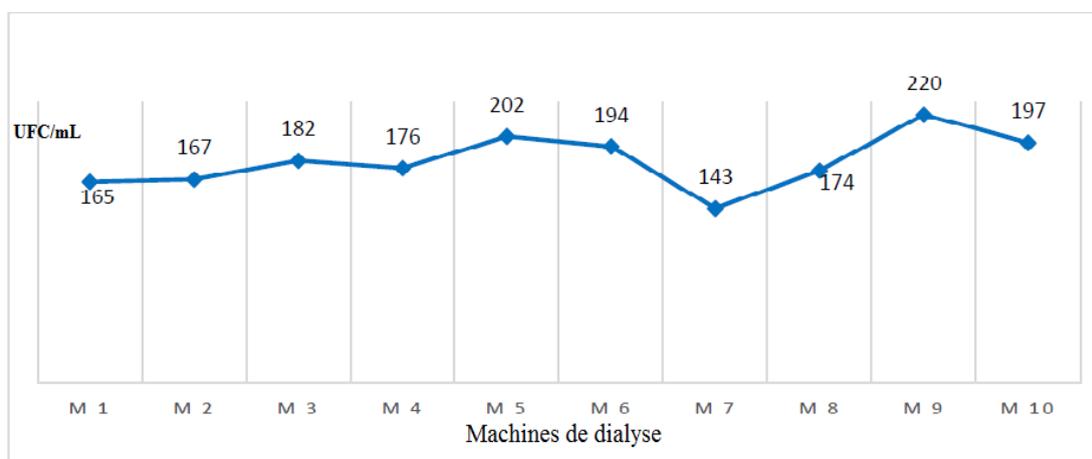


Figure 8 : Dénombrement bactérien de l'eau de dialyse prélevée à l'entrée des différentes machines de dialyse.

Selon les **Figures 7 et 8**, tous les échantillons d'eau à l'entrée des générateurs sont plus contaminés (182 UFC/mL en moyenne) à ceux de la boucle (118 UFC/mL en moyenne) présentant des quantités supérieures à celles autorisées par les normes de la pharmacopée européenne qui sont de 100 UFC/mL.

Sur vingt (20) échantillons d'eau analysés 17 dépassaient 100 UFC/mL et les 3 autres étaient à la limite dépassants 95 UFC/mL.

Les études similaires dans d'autres pays donnent des taux nettement inférieurs, ils varient de 1 à 18 UFC/mL, ceci peut être dû probablement à l'écologie microbienne des centres de dialyse étudiés mais également aux différences dans les méthodes d'étude (**Oumokhtar et al., 2013 ; Abualhasan et al., 2018**) ou alors à la méthode de désinfection et au nombre de patients/machine de dialyse et par jour.

Suite à tous ces taux bactériens alarmants à l'entrée des machines, il nous a été judicieux de savoir si toute cette contamination était liée à la capacité des bactéries à s'adhérer sur les tubulures d'eau reliant la boucle de distribution aux différentes machines de dialyse. L'examen à l'œil nu, nous laisse déjà suspecter la présence d'un biofilm par la couleur jaunâtre des tubulures et un aspect visqueux.

A cet effet dix segments de 1cm² de tubulures d'eau étaient sectionnés à l'entrée de chaque machine et étaient étudiés. A la première vue ils présentaient une étonnante couche de biofilm microbien.

Après détachement, les résultats des dénombrements des bactéries adhérees (biofilm) sur 1 cm² sont préoccupants avec des taux allant de 4,30 jusqu'au 6,74 Log UFC/cm² respectivement pour les machines 7 et 9 (**Figure 9**).

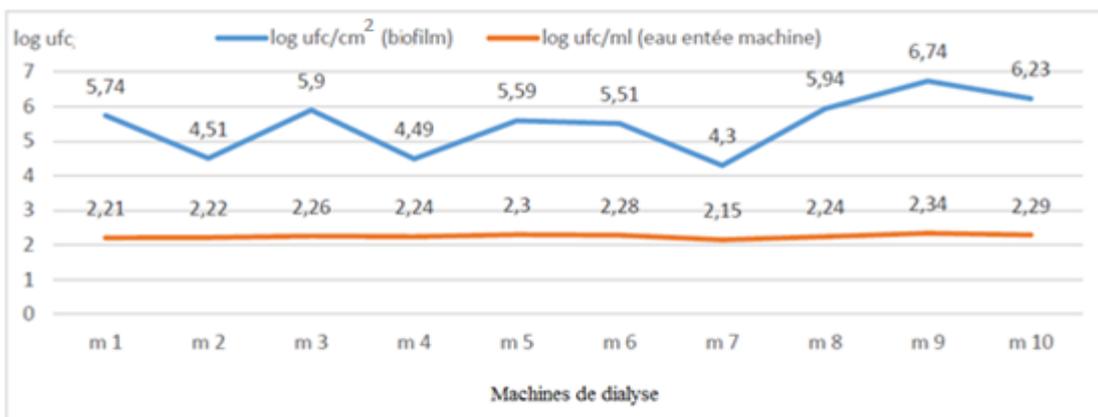


Figure 9 : dénombrement bactérien de l'eau de dialyse à l'entrée des générateurs et la charge microbienne adhéree sur 1 cm² de tuyaux reliant la boucle aux générateurs.

L'eau arrivant aux machines de dialyse est nettement plus contaminée à celle de la boucle, ceci peut être expliqué par la croissance de bactéries dans un biofilm, visible de manière macroscopique sous la forme d'un revêtement blanc sur les parois intérieures de tuyaux en PVC assurant la connexion entre la boucle et les machines de dialyse.

Cet état a été confirmé par le dénombrement des bactéries adhérees, où le niveau de contamination par machine était de l'ordre de 10^6 UFC/cm² soit 25000 fois supérieures à celui de l'eau de générateur 220 UFC/mL. Ces résultats sont supérieurs à ceux trouvés par **Marion-Ferey et al., 2003** où le niveau de contamination était de l'ordre de 10^4 UFC/mL.

Le nombre de bactéries adhérees par cm² sur tubulures variait pour chaque machine, ces tubulures font près de 2 mètres de longueur, impliquant dans ce cas un énorme nombre de bactéries adhérees à l'intérieur de ces tuyaux pouvant aller à 2000 fois le nombre trouvé. Ce niveau élevé de contamination présente un danger pour la santé des patients dialysés.

On assiste à une stagnation de l'eau dans ces tuyaux quand les machines sont à l'arrêt posant un véritable problème dans le système de traitement de l'eau de dialyse. Ces tubulures qui font la jonction entre les générateurs et la boucle de dialyse ont la particularité de n'être jamais désinfectées, ni lors de la désinfection de la boucle de dialyse ni lors de la désinfection de la machine après chaque séance (**Gounon, 2003**).

Pour assurer la désinfection du tuyau reliant la boucle de distribution d'eau au générateur de dialyse et pour prévenir la contamination liée aux bras morts, le détartrage et la désinfection des générateurs doivent pouvoir être effectués en même temps que la désinfection de la boucle de distribution d'eau. Cette désinfection simultanée peut être ponctuellement déconseillée sur des installations vieillissantes sur lesquelles un biofilm se serait déjà constitué (risque de relargage de biofilm de la boucle vers les machines) (**Grynfogel, 2005**).

L'introduction d'un nouveau procédé pour la désinfection facile, régulière et efficace de cette zone est donc indispensable pour la maintenance hygiénique des unités de traitement de l'eau afin de maintenir des valeurs de dénombrement bactérien en dessous des limites recommandées et donc une meilleure qualité de l'hémodialyse.

Les tuyaux doivent être remplacés régulièrement. La fréquence de remplacement recommandée tient compte et les recommandations du fabricant et le degré d'usure. En cas de contamination ou de présence de biofilms, cela doit être changé immédiatement (**Kessler et al., 2002**).

La déconnexion du générateur du circuit de distribution expose de diverses contaminations environnementales et manuportées. Par conséquent, les tuyaux doivent être stockés, manipulés et utilisés dans des conditions qui contrôlent ce risque. Par exemple, un simple lavage des mains avant et après manipulation des canalisations et une désinfection avant montage sont recommandés.

2. Résultats identification bactérienne

Après culture et selon le **Tableau 4**, nous constatons que les espèces de bactéries les plus fréquemment retrouvées dans l'eau des deux sites étudiés, étaient constituées essentiellement de *Bacillus* représentant près de la moitié des souches isolées soit 52%, suivies par les entérobactéries dont l'espèce *Enterobacter cloacae* 23,52% dans l'eau de la boucle et 17,39% dans l'eau arrivant aux générateurs. Les staphylocoques à coagulase positive et négative font partie également des contaminants de l'eau de dialyse. Des espèces souvent considérées comme marqueurs d'infections associées aux soins sont également présentes tels *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*.

Selon le **Tableau 4** et la **Figure 10**, toutes ces espèces étaient présentes dans les deux types d'eaux analysées à l'exception d'*Acinetobacter baumannii* qui se trouve uniquement dans l'eau prélevée à l'entrée des générateurs. La répartition des souches isolées dans les deux types d'eau varie d'une espèce à l'autre. Certaines espèces du genre *Bacillus* tels *B. mycoides*, *B. lentus*, *B. lechiformis*, *B. cereus* se trouvent plus à l'entrée des générateurs. De même quelques espèces de *Staphylococcus*. L'espèce *B. pumilis* est plus présente dans l'eau de boucle et prédominante de près de 9% à celle de l'entrée des générateurs.

Le taux d'occupation des entérobactéries (*Enterobacter* et *Klebsiella*) diminue dans l'eau à l'entrée des générateurs de dialyse. Celui-ci est remplacé par une augmentation des bactéries non fermentaires tels *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii*.

Sur 10 segments de tubulures (**Tableau 4**), cinquante-deux (52) souches étaient isolées et purifiées. Parmi les isolats bactériens, le genre *Bacillus* (21) était le plus fréquent avec prédominance de *B. mycoides* et *B. pumilis*. Les *Staphylocoques spp* (11) étaient plus régulièrement repartis. Les entérobactéries (11) également retrouvées et représentaient majoritairement par *Enterobacter cloacae* (07), *Klebsiella pneumoniae*(02), *Klebsiella oxytoca*(02). Les autres espèces présentes dans ce biofilm sont *Pseudomonas aeruginosa* (07) et *Acinetobacter baumannii* (02).

Tableau 4 : Souches isolées de l'eau de boucle, à l'entrée des générateurs et segments de tubulure.

	Eau boucle		Eau entrée machine		Biofilm tubulures	
<i>B. pumilis</i>	(15) 22,09%	51,49%	(6) 13,06%	49,99%	(7) 13,46%	40,38%
<i>B. mycoïdes</i>	(11) 16,17%		(8) 17,39%		(6) 11,54%	
<i>B. lentus</i>	(5) 7,35%		(5) 10,86%		(4) 7,69%	
<i>B. cereus</i>	(3) 4,41%		(2) 4,34%		(3) 5,77%	
<i>B. lechiniformis</i>	(1) 1,47%		(2) 4,34%		(1) 1,92%	
<i>S. epidermidis</i>	(3) 4,41%	11,76%	(3) 6,55%	15,25%	(3) 5,77%	21,15%
<i>S. warneri</i>	(3) 4,41%		(2) 4,36%		(4) 7,69%	
<i>S. aureus</i>	(1) 1,47%		(1) 2,17%		(2) 3,85%	
<i>S. saprophyticus</i>	(1) 1,47%		(1) 2,17%		(2) 3,85%	
<i>Enterobacter cloacae</i>	(16) 23,52%	23,52%	(8) 17,39%	17,39%	(7) 13,46%	13,46%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	(4) 5,88%	5,88%	(2) 4,34%	4,34%	(2) 3,85%	7,69%
<i>Klebsiella oxytoca</i>	(0) 0,00%		(0) 0,00%		(2) 3,85%	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(5) 7,35%	7,35%	(5) 10,86%	10,86%	(7) 13,46%	13,46%
<i>Acinetobacter baumannii</i>	(0) 0,00%	0%	(1) 2,17%	2,17%	(2) 3,85%	3,85%
Total	(68) 100%	100%	(46) 100%	100%	(52) 100%	100%

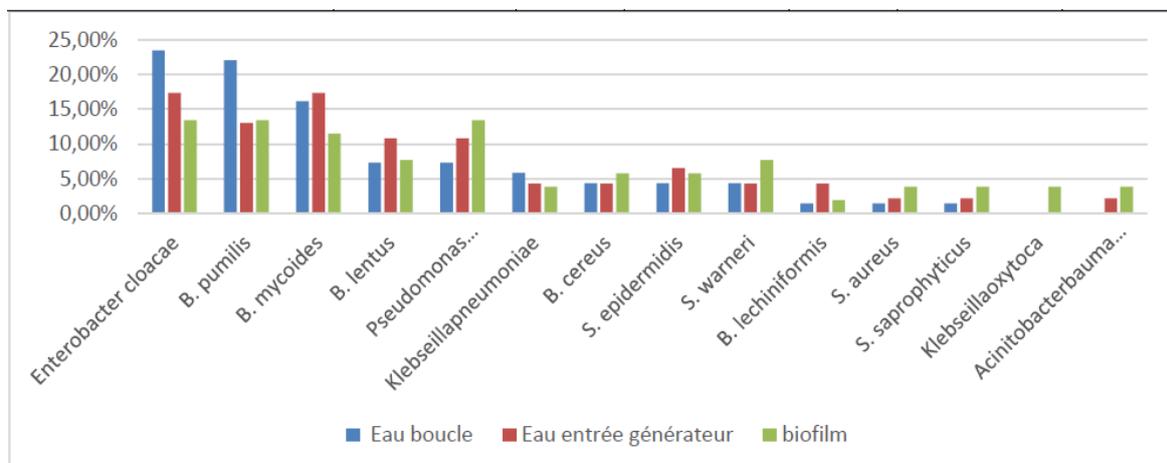


Figure 10 : Pourcentages des souches isolées de l'eau de boucle, de l'eau entrée générateurs de la dialyse et du biofilm (tubulures).

Chaque système de production d'eau de dialyse présente une écologie microbienne particulière, vu la différence dans la source d'eau, l'état général d'hygiène des réservoirs, les traitements subis, le degré et la fréquence de désinfection. L'identification des bactéries présentes dans l'eau de dialyse (boucle et générateurs) montre la présence majeure de bactéries couramment retrouvées dans l'eau telles les *Bacillus* et les coliformes dont *Enterobacter* et *Klebsiella* (Gomila et al., 2005). Les espèces bactériennes trouvées dans notre étude sont aussi identifiées par d'autres études similaires [(Gomila et al., 2005) ;(Oumokhtar et al., 2013) ; (Okunola et Olaitan, 2016)].

La situation qui semble très inquiétante est la présence de bactéries marqueurs et pathogènes telles *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *S aureus* dans l'eau des générateurs, et par conséquent le dialysat. Ces bactéries pouvant engendrer de graves infections chez les patients dialysés par libération de toxines, et leurs aptitudes de vivre en biofilm car presque toutes sont formatrices de biofilm et résistantes à tous désinfectants (Gomila et al., 2005), et source d'endotoxines, présentent une vraie menace dans processus de dialyse [(Roth et Jarvis, 2000) ;(Gomila et al., 2005) ; (James, 2006)].

3. Résultats de l'écologie microbienne par machine de dialyse

Chaque segment sectionné de la tubulure présente une écologie microbienne différente. Les tuyaux des machines 8 et 9 sont très contaminés et leurs biofilms sont composés de plusieurs espèces, suivis des machines 10, 3 et 4 où l'espèce *B. pumilis* est la plus représentative. L'espèce *Enterobacter cloacae*, *B. mycoides*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* et *S. aureus* sont également présentes.

La plupart des espèces isolées depuis le biofilm se trouvent aussi dans l'eau à l'entrée des machines de dialyse. Pour certaines espèces leur présence est majoritairement dans le biofilm à savoir *K. oxytoca*. Les autres espèces se trouvent dans les deux types de prélèvements (eau et biofilm).

	<i>B. cereus</i>	<i>B. lechiformis</i>	<i>B. pumilis</i>	<i>B. lentus</i>	<i>B. mycoides</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. saprophyticus</i>	<i>S. warneri</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. oxytoca</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>A. baumannii</i>	Total
M1				X X	X X					X			X		3 3
M2	X	X X	X		X				X X				X		4 4
M3		X	X X		X		X	X X		X X			X X		6 5
M4			X X		X X		X X			X			X X		5 4
M5			X	X X						X X	X X		X X		5 4
M6		X	X X	X X	X X			X		X		X			3 5
M7			X X		X X		X X			X					4 3
M8	X X	X	X X			X			X X	X X	X X	X	X X		6 9
M9			X	X X	X X	X X			X X	X X			X	X X	6 8
M10			X	X X	X X		X			X X X			X	X	4 7
total	2 1	2 3	6 7	5 4	8 6	1 2	3 3	1 2	2 4	8 7	2 2	2	5 7	1 2	46 52

Figure 11 : Répartition des souches identifiées dans l'eau à l'entrée des machines et dans les biofilm par machines.

X : souches eau entrée machine ; X : souches tubulaires

4. Résultats capacité de formation de biofilm

Toutes les surfaces dans les voies de liquide d'hémodialyse sont susceptibles à l'invasion de biofilm [(Man et al., 1998) ; (Phillips et al., 1999) ; (Capelli et al., 2000)]. L'importance et la vitesse de la croissance de biofilm dépendront de trois facteurs principaux : les types de matériaux ; la conception du système de distribution, y compris les débits, les zones mortes et la fréquence et l'efficacité des traitements de désinfection (Phillips et al., 1999).

Très peu d'études s'adressent aux biofilms dans des systèmes d'hémodialyse, cependant, les études qui ont été réalisées conviennent que les biofilms sont un problème majeur pour lequel les traitements courants de désinfection sont inefficaces (Marion-Ferey et al., 2003 ; Holmes et al., 2004 ; Isakozawa et al., 2016).

Les souches isolées de segments des tuyaux montrent une différence vis-à-vis de la capacité de formation de biofilm. 42/52 souches ont une capacité à former un biofilm, plus de la moitié (29) sont fortement formatrices, 13 souches avec une capacité moyenne et 10 sont faiblement formatrices de biofilm (Figure 12).

Presque toutes les souches isolées des tubulures des machines 9 et 8 sont hyper-productrices de biofilm, dont *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *E. cloacae*, *S. aureus*. La formation de biofilm chez les souches isolées de tubulures est devenue un caractère héréditaire, ces bactéries sont dotées de gènes de biofilm qui s'expriment facilement là où les conditions deviennent défavorables et passent de la forme planctonique à la forme sessile rapidement.

Ainsi on suppose qu'un transfert croisé de gènes impliqués dans le mode biofilms s'effectue entre les différentes espèces vivantes ensemble dans le même biofilm.

	<i>B. cereus</i>	<i>B. lechiniiformis</i>	<i>B. pumilis</i>	<i>B. lentus</i>	<i>B. mycoides</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. saprophyticus</i>	<i>S. warneri</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. oxytoca</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>A. baumannii</i>	Total
M1				faible	faible								forte		3
M2		forte	faible					forte	forte	faible					4
M3		faible	forte					forte		faible			forte		5
M4			forte		forte		faible						forte		4
M5				forte						forte	faible		faible		4
M6			faible		forte			forte		faible		forte			5
M7			forte		faible		forte								3
M8	forte	faible	forte			faible			forte	faible	forte	faible	faible		9
M9			forte	faible	faible	faible			faible	faible			faible	faible	8
M10				faible	forte		faible		faible	forte			forte	faible	7
Total	1	3	7	4	6	2	3	2	4	7	2	2	7	2	52
				10	faible			13	moyenne			29	forte		

Figure 12 : Capacité de formation de biofilm chez les souches isolées des tubulures.

5. Résultats CMI désinfectant OXY ANIOLYSE 9000 (acide peracétique et peroxyde d'hydrogène)

La désinfection doit être préventive et fréquente pour permettre à l'unité de dialyse de bien fonctionner et d'éviter les contaminations bactériennes. Quand une stratégie stricte de désinfection est suivie, il est possible de maintenir l'activité microbiologique à de faibles niveaux pendant une longue période.

L'étude de la concentration minimale inhibitrice des souches testées (isolées de tubulure) a révélé que les deux tiers (65%) des souches sont sensibles au désinfectant utilisé à la concentration recommandée par le fournisseur (inférieur ou égal à 1/33), néanmoins 34% (18/52) des souches nécessitent une concentration supérieure à celle recommandée. Six (6) d'entre elles nécessitent des concentrations très élevées de désinfectants de l'ordre de 1/10 (**Tableau 5**).

Tableau 5 : Résultats CMI désinfectants des souches testées.

CMI désinfectants	Nombre de souches	Souches
1/10	6	(2) <i>K. pneumoniae</i> (2) <i>E. cloacae</i> (1) <i>P. aeruginosa</i> (1) <i>K. oxytoca</i>
1/20	12	(2) <i>E. cloacae</i> (2) <i>P. aeruginosa</i> (2) <i>B. cereus</i> (1) <i>K. oxytoca</i> (1) <i>B. mycoides</i> (1) <i>B. pumilus</i> (1) <i>S. warneri</i> (1) <i>S. aureus</i> (1) <i>S. saprophyticus</i>
1/33	3	(2) <i>E. cloacae</i> (1) <i>A. baumannii</i>
1/50	23	(6) <i>B. pumilus</i> (3) <i>B. mycoides</i> (3) <i>S. epidermidis</i> (3) <i>S. warneri</i> (2) <i>B. lentus</i> (2) <i>P. aeruginosa</i> (1) <i>E. cloacae</i> (1) <i>B. cereus</i> (1) <i>S. aureus</i> (1) <i>A. baumannii</i>
1/100	5	(2) <i>P. aeruginosa</i> (1) <i>B. lechiformis</i> (1) <i>B. lentus</i> (1) <i>S. saprophyticus</i>
1/200	3	(1) <i>B. Lentus</i> (2) <i>B. mycoides</i>

Les souches les plus résistantes sont des bactéries à Gram négatif : *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella oxytoca*. Certaines souches de *Bacillus* et *Staphylococcus* sont aussi résistantes au désinfectant à la concentration recommandée.

Selon notre enquête et observance, la désinfection du système de traitement d'eau n'était pas effectuée régulièrement, et aucune procédure n'était documentée clairement dans cette unité de dialyse (CHU de Tlemcen).

Selon les dires du personnel aucun protocole d'entretien des systèmes de purification de l'eau n'était connu et appliqué au niveau du service. L'ensemble du personnel pensait que le filtre dialyseur assure une protection totale aux patients, et ne laisse passer aucun danger dans le sang des patients.

Ces résultats dévoilent que les responsables du système d'approvisionnement en eau ne sont pas conscients de l'importance de la maintenance régulière et du contrôle de la qualité microbiologique du système de purification de l'eau. De même l'approvisionnement des désinfectants n'était pas assuré régulièrement, particulièrement quand il y a un changement du désinfectant.

Les bactéries peuvent être présentes n'importe où à l'intérieur de la tuyauterie de dialyse. Il est essentiel que le désinfectant utilisé pour le nettoyage atteigne tous les points de la tuyauterie. Pour une désinfection efficace, l'ensemble du système de tuyauterie doit être complètement désinfecté, y compris la zone d'extrémité, où la concentration de désinfectant a tendance à se diluer. Une fois formés, les biofilms ont tendance à résister aux effets des désinfectants de nettoyage (**Isakozawa et al., 2016**).

Le désinfectant chimique n'a pas été efficace puisqu'il a permis d'éliminer qu'une certaine quantité de bactéries en mode biofilms à des températures normales. **Cappelli et al., 2000** attribuent cette inefficacité au fait où les bactéries sont protégées par une couche visqueuse formée à l'intérieur du tuyau suite à l'oxydation des protéines à la surface du biofilm par le désinfectant.

Il est raisonnable de supposer que l'utilisation de désinfectants de nettoyage inadaptés pourrait conduire le biofilm restant à former une barrière encore plus forte, ou permettre la formation de biofilms à l'intérieur de la tuyauterie en peu de temps.

De même, l'exposition à long terme aux désinfectants de nettoyage peut affecter le matériau. Les biofilms établis résistent aux désinfectants de nettoyage et peuvent devenir une cause constante de contamination biologique.

L'étude de **Suman et al., 2013** a indiqué qu'en présence de conditions défavorables, les bactéries peuvent changer leurs morphologies et se diriger vers la production de plus de biofilms comme un mécanisme de protection, pour surmonter les conditions défavorables.

6. Imagerie de biofilm des souches bactériennes isolées des tubulures d'eau de dialyse

La microscopie électronique à balayage est une technique capable de produire des images en haute résolution de la surface d'un échantillon via l'absorption d'électrons. Elle fournit une information qualitative sur la structure et la matrice des biofilms. Elle est utilisée lors d'études de l'effet de traitements sur les biofilms [(Ceri et al., 1999 ; Nishimura et al., 2006)]

La préparation des échantillons nécessite une étape de déshydratation et de revêtement avec un matériel conducteur qui peuvent altérer la structure du biofilm. La matrice des biofilms peut être modifiée par la chaleur générée par le faisceau d'électrons (**Wu et al., 2014**).

Vu que les tubulures de dialyse présentaient de visu une couche marron et après confirmation de la capacité des souches à former un biofilm, nous avons essayé de le reproduire sur des morceaux de tubulures (identiques à ceux reliant la boucle avec les machines de dialyse) environ de 1 cm² pendant un temps seulement de 24 heures (une journée) et de les visualiser par microscopie électronique, et d'apprécier la formation en biofilm de chacune des bactéries isolées des tubulures d'eau.

Les deux images ci-après (**Figure 13**) représentent un biofilm de 24 heures d'*Enterobacter cloacae*. On observe des bactéries regroupées en amas irréguliers qui recouvrent les surfaces intérieures attachées au support. Ces bactéries sont entourées d'une épaisse matière exo-polymérique.

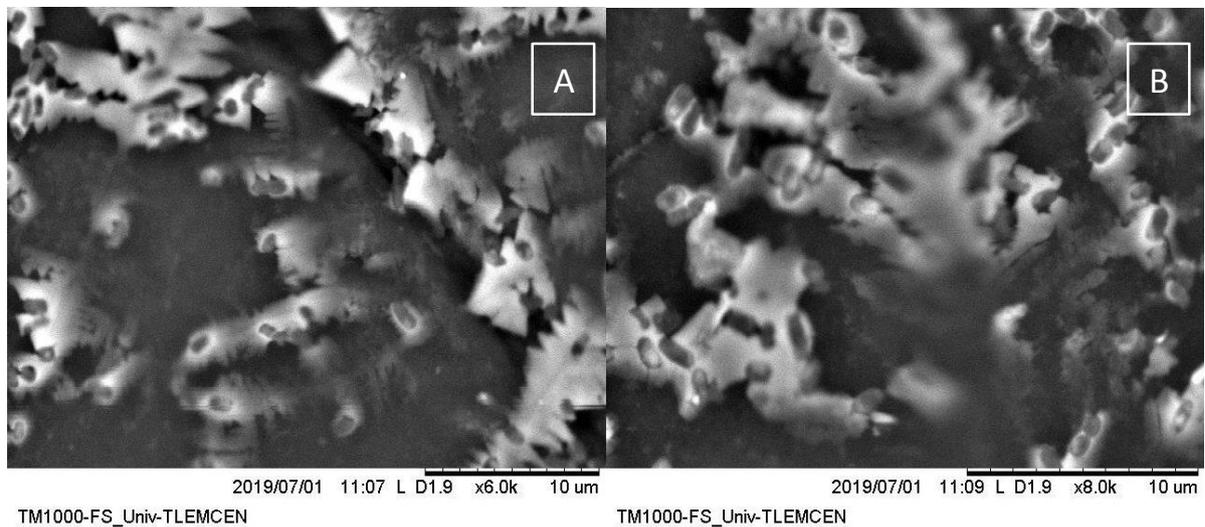


Figure 13 : Images de microscopie électronique de formation de biofilm d'*Enterobacter cloacae* sur tubulures de machines de dialyse après 24 heures (A [X 6000] et B [X 8000]).

Quant à la visualisation des biofilms de *Klebsiella pneumoniae* ils présentent une structure anarchique qui s'étale horizontalement. Les cellules bactériennes sont rarement juxtaposées. La matrice exo-polymérique est minimale (**Figure14**).

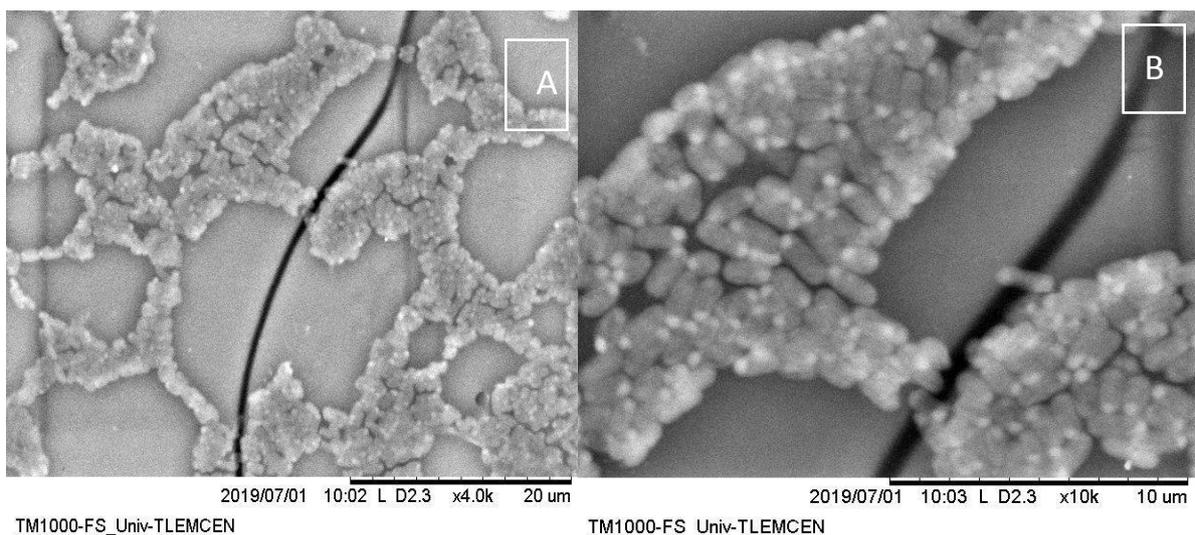


Figure 14 : Images de microscopie électronique de formation de biofilm de *Klebsiella Pneumoniae* sur tubulures d'eau de machines de dialyse après 24 heures (A [X 4000] et B [X 10000]).

Les souches de *Pseudomonas aeruginosa* ont des biofilms en structure de champignon. Les bactéries se réunissent les unes au-dessus des autres, elles sont entourées par une épaisse couche de substance exo-polymérique (**Figure 15**).

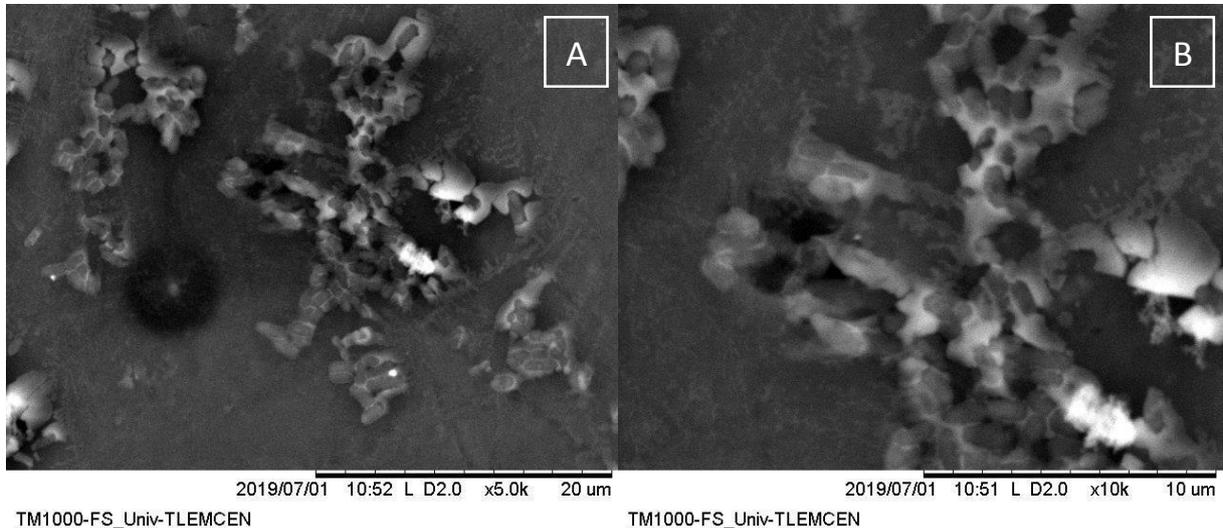


Figure 15 : Images de microscopie électronique de formation de biofilm de *Pseudomonas aeruginosa* sur tubulures d'eau de machines de dialyse après 24 heures (A [X 4000] et B [X10000]).

D'après la **Figure16** on constate que la bactérie *Acinetobacter baumannii* forme un biofilm mature en amas irréguliers, les cellules bactériennes ne sont pas distinctes.

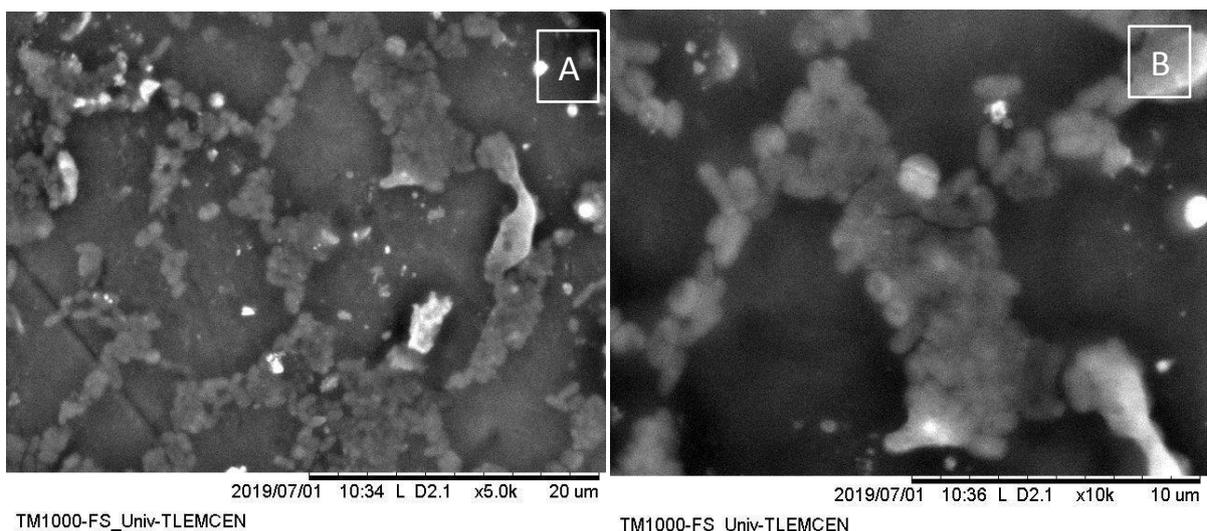


Figure 16 : Images de microscopie électronique de formation de biofilm d' *Acinetobacter baumannii* sur tubulures d'eau de machines de dialyse après 24 heures (A [X 5000] et B [X10000]).

Ces images ci-dessous montrent des biofilms de *Staphylococcus aureus*. Ces derniers sont en amas distincts (grappe de raisin), on remarque des petits biofilms (phase d'adhésion).

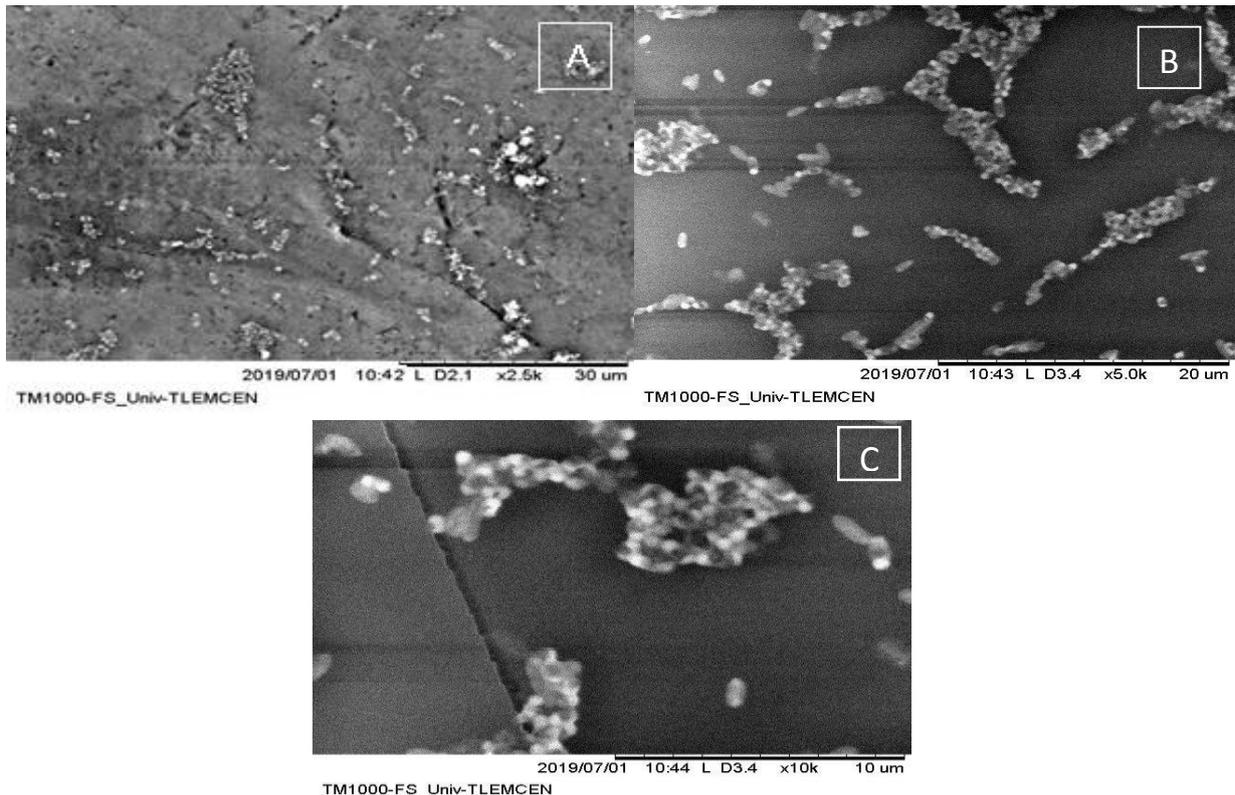


Figure 17 : Images de microscopie électronique de formation de biofilm de *Staphylococcus aureus* sur tubulures d'eau de machines de dialyse après 24 heures (A [X 2500], B [X 5000], C [X10000]).

Les deux images de la **Figure 18** montrent un biofilm de *Staphylococcus epidermidis*. On observe le regroupement particulier du staphylocoque (en grappe de raisin), les bactéries sont regroupées l'une sur l'autre de façon anarchique, à certains endroits on sent un voile polysaccharidique qui les relie d'une façon compacte confirmant la possibilité de formation d'un beau biofilm.

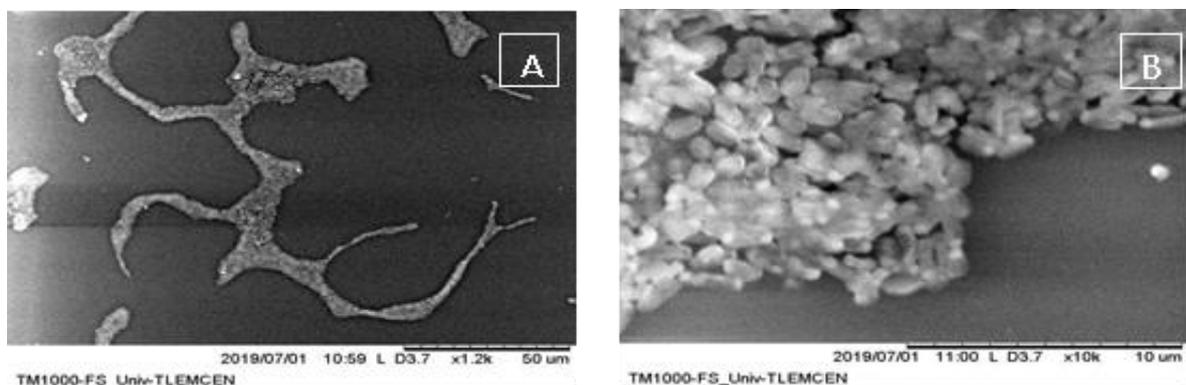


Figure 18 : Images de microscopie électronique de formation de biofilm de *Staphylococcus epidermidis* sur tubulures d'eau de machines de dialyse après 24 heures (A [X 1200], B [X10000]).

Les souches de *Bacillus cereus* envahissent toute la surface du support, elles sont nombreuses et adhèrent bien au support. Dans certains endroits de la tubulure, les cellules sont rapprochées et collées les unes aux autres en formant des petits amas où on observe le début de la constitution de la matrice polysaccharidique (Figure 19).

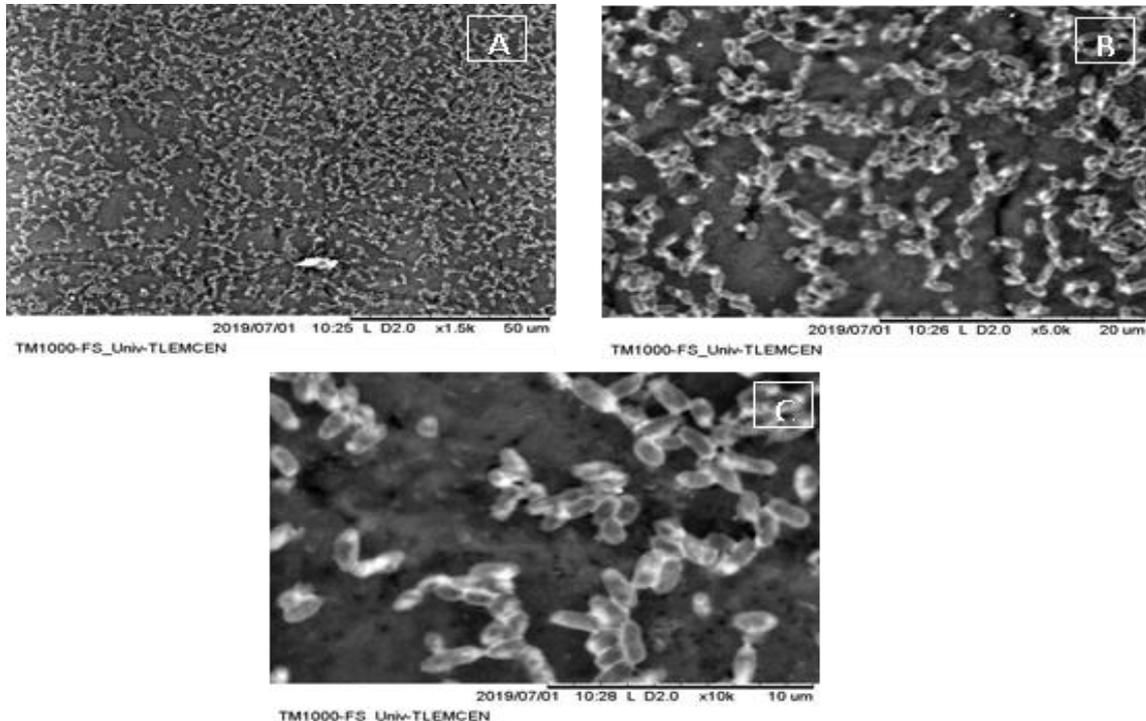


Figure 19 : Images de microscopie électronique de formation de biofilm de *Bacillus cereus* sur tubulures d'eau de machines de dialyse après 24 heures (A[X 1500], B [X 5000], C [X10000]).

Les biofilms de certaines espèces sont caractérisés par la présence de la matrice exopolymérique épaisse (*Enterobacter cloacae* et *Pseudomonas aeruginosa*), tandis que le biofilm d'*Acinetobacter baumannii* présente une fine couche d'EPS. Dans le biofilm de *Bacillus cereus* on voit nettement les cellules collées les unes des autres. Ces situations sont dues à plusieurs facteurs et paramètres qui peuvent accélérer ou non la formation de la matrice du biofilm telle la cinétique de croissance du biofilm/espèces, la composition du milieu, les conditions de croissance, mais également à la composition de la matrice qui varie selon l'espèce bactérienne. Un des EPS le plus souvent retrouvés est un polymère de β -1,6-N-acétyl-D-glucosamine. On retrouve ce polymère chez plusieurs espèces bactériennes, dont *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis* (Karatan et Watnick, 2009).

La cellulose, un polymère linéaire de glucose, est également retrouvée fréquemment chez diverses espèces et genres bactériens, dont *E. coli*, *Enterobacter* et *Pseudomonas*. Il existe plusieurs autres polysaccharides dont le glucane chez *Streptococcus mutans* et l'alginate retrouvé chez *Pseudomonas* (Karatan et Watnick, 2009).

7. Evolution des cultures mixtes planctoniques

Le mode de vie des bactéries dans le milieu naturel suit un cycle passant d'un style de vie planctonique, où les cellules sont séparées les unes des autres, à un mode de vie en communautés multi-espèces adhérentes, aussi appelées biofilms. Le style de vie planctonique a toujours été le plus étudié en microbiologie, or il s'avère que le mode de vie en biofilm est fondamental pour les bactéries.

Dans cette partie on essaye d'apprécier l'évolution et le comportement des bactéries sélectionnées seules et/ou en association. De ce fait des mesures de densité optique étaient réalisées sur des cultures planctoniques.

Les **Figures 20, 21, 22 et 23** montrent que les cultures mono-espèce de toutes les espèces diminuent d'une façon remarquable au bout de 96h avec des densités optiques allant de 2 à 1 et 0,5. Tout de même nous notons une réaction un peu différente pour l'espèce *Pseudomonas aeruginosa* où on assiste à une densité optique presque stable lors des 72h suivi d'une chute dans la valeur de la densité optique qui passe de 2 à 0.5 (**Figure 22**).

On observe une diminution de la densité des populations mono-planctoniques au cours du temps. On assiste à une lyse cellulaire des bactéries planctoniques vu que les DO diminuent dans le milieu de culture en dessous des cultures mixtes, cela pourrait être causé par le manque d'accès en oxygène ou en nutriments.

Quant aux cultures mixtes, les densités optiques restent stables de 24h à 96h aux DO initiales. Exception faite pour les cultures mixtes de *Pseudomonas aeruginosa* avec *Staphylococcus epidermidis* et *Klebsiella pneumoniae* avec *Staphylococcus epidermidis* (**Figure 22, 23**) qui présentent une légère augmentation à 96 heures en les comparant avec les densités mesurées à 24 heures, 48 heures et 72 heures.

En milieu liquide, une population bactérienne est capable de se déplacer vers des conditions qui lui sont plus favorables. Pour ce faire, chaque bactérie suit une « marche aléatoire », faite de portions de chemins droits et d'événements très brefs de réorientation dont elle biaise la fréquence. Lorsqu'une bactérie *E. coli* s'approche d'une surface, l'hydrodynamique la contraint à adopter une trajectoire circulaire à quelques centaines de nanomètres au-dessus de la surface, et elle reste en mouvement continu dans le milieu (**Delville, 2021**).

En analysant ces figures, on a l'impression que les bactéries planctoniques mises ensemble s'entraident pour rester le plus longtemps en vie dans le milieu et cela indépendamment de leur nature.

L'installation d'une nouvelle espèce bactérienne au sein d'une culture préexistante offre un avantage aux deux populations, en favorisant les transferts génétiques horizontaux et en permettant la formation de consortiums métaboliques (**Roberts et al., 2001**).

La mesure de la densité optique de la phase planctonique des cultures pures et mixtes montre l'effet de compétition entre espèces, les deux espèces entrent en compétition pour la recherche des éléments nutritifs présents dans le milieu. Aussi les cellules bactériennes forment des agrégats flottants afin de rester en contact avec les nutriments (**Quijano et al., 2017**).

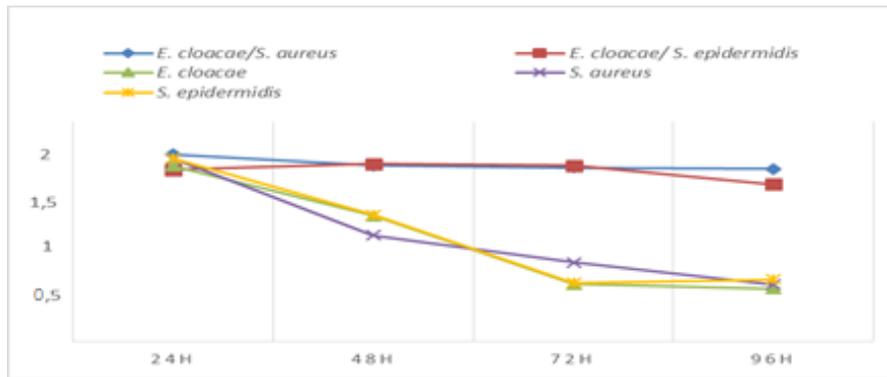


Figure 20 : DO de la phase planctonique d'*E. cloacae*, *S. aureus*, *S. epidermidis* en culture mono-espèces et mixte.

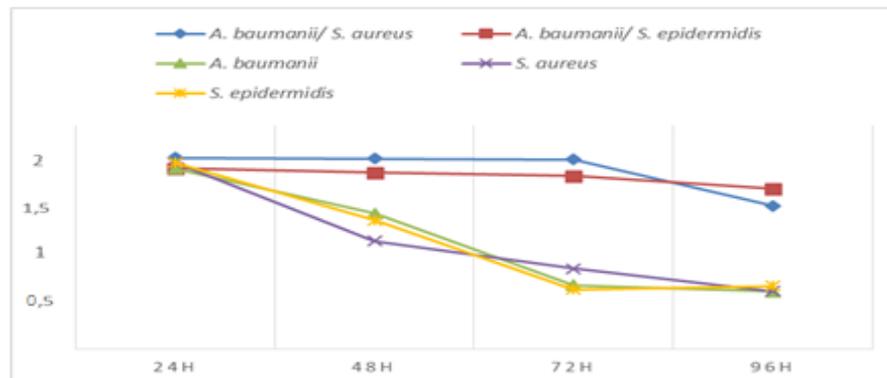


Figure 21 : DO de la phase planctonique d'*A. baumannii*, *S. aureus*, *S. epidermidis* en culture mono espèces et mixte.

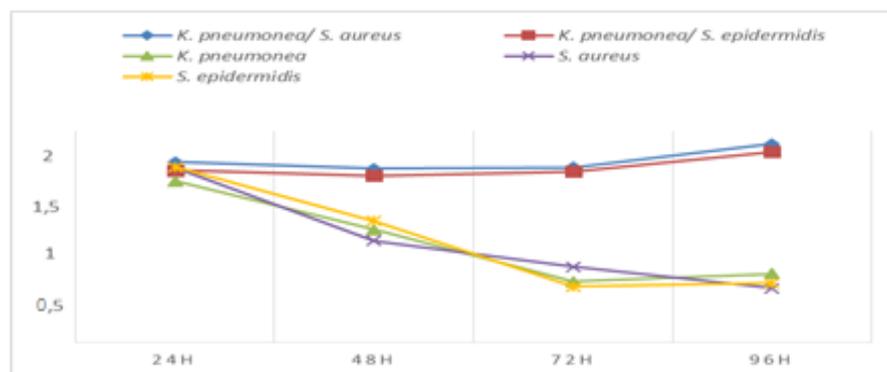


Figure 22 : DO de la phase planctonique de *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. epidermidis* en culture mono espèces et mixte.

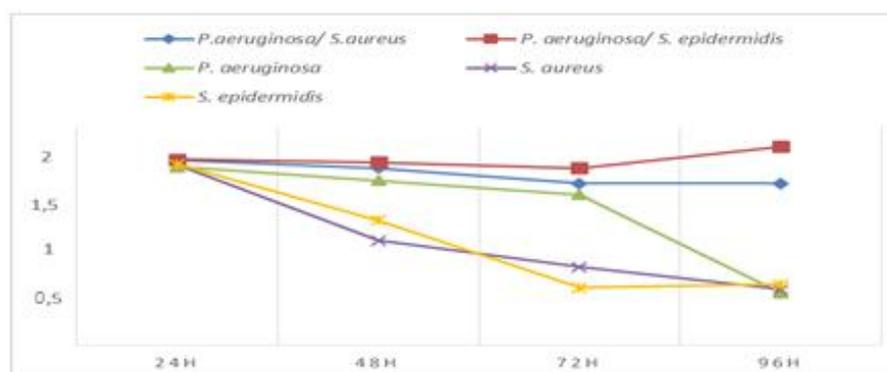


Figure 23 : DO de la phase planctonique de *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *S. epidermidis* en culture mono espèces et mixte.

8. Evolution des cultures mixtes en mode biofilm

Les microorganismes ne sont pas couramment présents à l'état planctonique, mais forment principalement des biofilms à double et multi-espèces dans presque tous les environnements. Les bactéries dans les biofilms multi-espèces coopèrent, rivalisent ou ont des interactions neutres selon les espèces impliquées.

Pour mieux comprendre et modéliser la colonisation bactérienne et la contamination des tubulures d'eau de dialyse (surfaces abiotiques), il faut utiliser un modèle de biofilm. La majorité des colonisations bactériennes retrouvée dans cette étude sont le fait d'au moins deux espèces, mais cela est difficile à modéliser *in vitro*.

De ce fait, nous avons essayé dans cette partie de proposer des scénarios de développement de biofilms mono et bi-espèces formés par *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis* et d'autres bactéries souvent responsables des infections associées aux soins tels que *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* et *Enterobacter cloacae* au cours des 24, 48, 72 et 96 heures. La formation de biofilm a été évaluée par un dénombrement des unités formant des colonies par centimètre carré (UFC/cm²).

C'est vrai que très peu d'études ont réalisé des combinaisons entre ces espèces en biofilms mixtes (duel espèce). Dans la plupart du temps, l'objectif sur les biofilms est principalement basé sur des cultures pures mono espèces, mais on sait depuis longtemps que ces résultats sont trompeurs et ne reflètent pas la réalité en raison de la physiologie bactérienne, de morphologie, le métabolisme et aussi la structure, quand les cellules bactériennes sont cultivées avec d'autres espèces.

Selon les histogrammes suivants (**Figures 24, 25, 26 et 27**), nous observons des comportements différents des bactéries citées selon qu'elles soient seules, en présence du Staphylocoque doré ou du *Staphylococcus epidermidis*. A première vue, Il apparaît d'une façon très nette que la croissance du biofilm de *S. epidermidis*, quand il est en mixte avec les bactéries citées, essentiellement pour les espèces *Acinetobacter baumannii* et *Pseudomonas aeruginosa* est toujours inférieur à sa croissance seule.

On assiste à des croissances antagonistes où le *Staphylococcus epidermidis* décroît de 3 à 4 log pour atteindre des taux inférieurs aux dénombrements initiaux ; exception faite avec *A. baumannii* où on remarque que le *Staphylococcus epidermidis* reprend sa croissance en biofilm après 72h pour atteindre une valeur de 6,4 log UFC/cm², tout de même cette valeur reste toujours inférieur à celle d'*A. baumannii* qui est de 7,2 log UFC/cm².

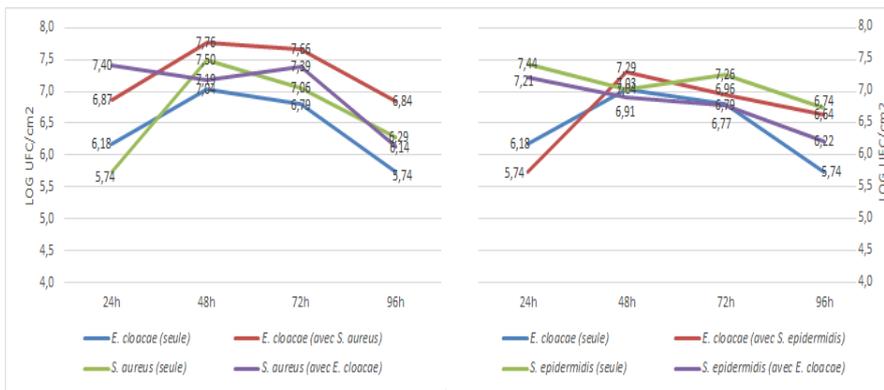


Figure 24: Evolution du nombre d'*E. cloacae*, *S. aureus* et *S. epidermidis* dans des biofilms mono-espèce et mixte.

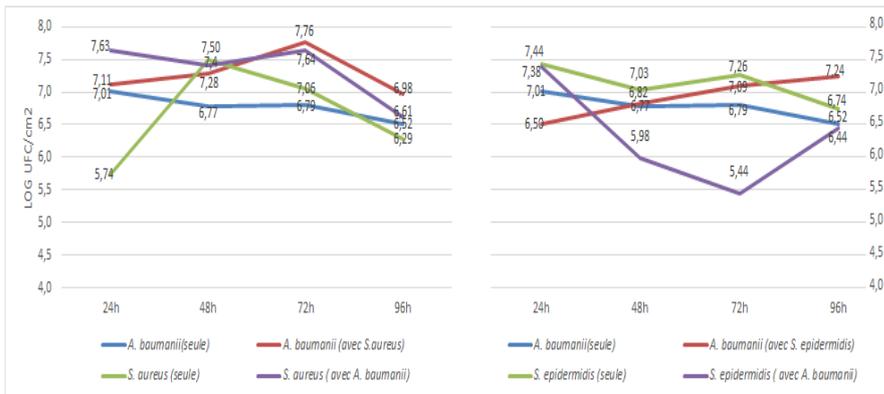


Figure 25: Evolution du nombre d'*A. baumannii*, *S. aureus* et *S. epidermidis* dans des biofilms mono-espèce et mixte.

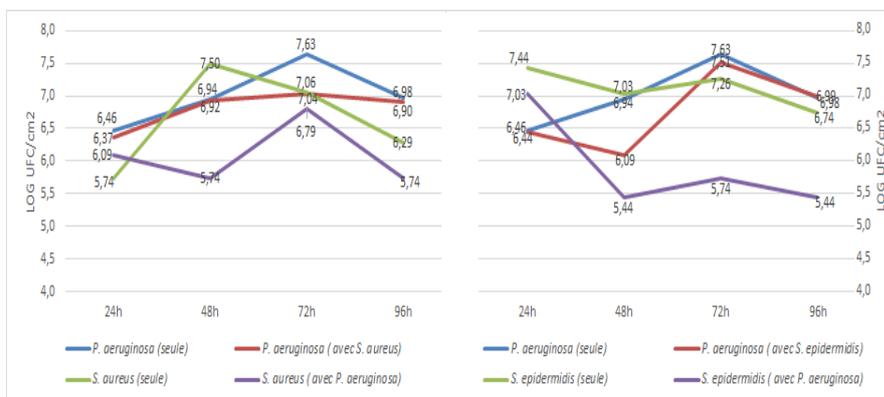


Figure 26 : Evolution du nombre de *P. aeruginosa*, *S. aureus* et *S. epidermidis* dans des biofilms mono-espèce et mixte.

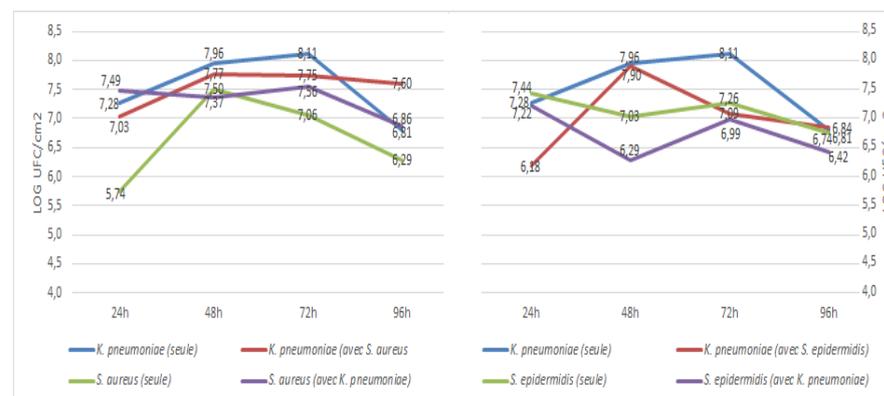


Figure 27: Evolution du nombre de *K. pneumoniae*, *S. aureus* et *S. epidermidis* dans des biofilms mono-espèce et mixte.

Cet antagonisme est bien visualisé pour *Acinetobacter baumannii* (**Figure 25**) où sa croissance en biofilm mixte ne cesse d'augmenter au cours du temps pour atteindre une croissance maximale avec un log de 7.24 soit supérieur d'un log de sa croissance en biofilm seule.

Pour *Pseudomonas aeruginosa* après 72h, on assiste une bonne croissance en mixte avec *Staphylococcus epidermidis* pour atteindre un log max de 7,51, presque égal à celui du biofilm de cette bactérie seule. Le biofilm de *Staphylococcus epidermidis* en mixte avec *P. aeruginosa* est nettement inférieur à celui lorsqu'elle est en biofilm toute seule.

La présence de *Pseudomonas aeruginosa* dans les biofilms contenant *Staphylococcus epidermidis* induit un ralentissement précoce aux alentours de 48h. Ce ralentissement est surmonté après quelques heures alors que *Pseudomonas aeruginosa* avec *Staphylococcus epidermidis* s'est délocalisée pour s'étendre vers un max de 7.63 à 72h comme si elle était seule. Nous pensons qu'il existerait une compétition de ces deux espèces pour un nutriment commun.

Effectivement, selon **Pihl et al., 2010**, après la co-inoculation dans proportions égales, *P. aeruginosa* et *S. epidermidis*, ces souches pourraient coexister jusqu'à 18 h. Après ce point, les cellules de *S. epidermidis* dans le biofilm sont contrôlées par *P. aeruginosa*.

Ces données suggèrent qu'il y a deux étapes dans les interactions entre *P. aeruginosa* et *S. epidermidis*, la première comprend l'induction du détachement des cellules viables de *S. epidermidis* de biofilm, alors que dans la deuxième phase il y aura la lyse cellulaire qu'elle provoque le détachement total (**Pihl et al., 2010**).

L'effet de *P. aeruginosa* sur *S. epidermidis* dépend de la souche, certaines souches de *P. aeruginosa* ont un effet plus prononcé sur quelques souches de *S. epidermidis* tandis que d'autres sont plus résistantes (**Pihl et al., 2010**).

Néanmoins, il y a des produits extracellulaires qui empêchent la fixation initiale de certains *S. epidermidis*. Cela pourrait être une option intéressante pour le développement de revêtements des surfaces pour les dispositifs médicaux à demeure, comme cathéters de dialyse péritonéale (**Pihl et al., 2010**). Toutefois, ces cellules dispersées de *S. epidermidis* ne sont pas tuées, ce qui les rend moins appropriées comme option de traitement mais seulement intéressant comme stratégie de prévention.

En 2013 **Brandon et al.**, affirment également que *P. aeruginosa* perturbe le biofilm de *S. epidermidis*. Cette perturbation et effet négatif sur *S. epidermidis* sont assurés par plusieurs composés dont, les élastases, la pyocyanine, N- acyl-homosérine lactone et les rhamnolipides.

Tout de même au fil du temps **Alves et al.**, en 2018 annonce que l'espèce *S. epidermidis*, est connue par la production de nucléase qui empêche ou perturbe la croissance de biofilm chez certaines bactéries à Gram négatif. Il produit également la protéine SPA (**Staphylococcal Protein A**) qui diminue la formation de biofilm chez ces bactéries (**Ambruster et al., 2016**).

Selon **A. Hotterbeekx**, *P. aeruginosa* induit la dispersion du biofilm du *S. epidermidis*. Les molécules anti-staphylocoques produites par *P. aeruginosa* sont également actives contre d'autres staphylocoques, bien que certains soient plus résistants à la destruction telle que *S. aureus* (**Hotterbeekx et al., 2017**).

P. aeruginosa a été étudiée pour inhiber efficacement et perturber les biofilms établis de *S. epidermidis* et induire un décollement sans mise à mort lors de la formation de biofilms [(**Qin et al., 2009**); (**Pihl et al., 2010**)].

Contrairement, le comportement *S. aureus*, est totalement différent de celui de *S. epidermidis*, ce dernier cohabite avec *Pseudomonas aeruginosa*, suit sa croissance mais avec des charges bactériennes plus élevées que s'il était seul en biofilm. Malgré l'utilisation d'un inoculum initial identique, *P. aeruginosa* en biofilm mixte a atteint une population de biofilms supérieur à celle de *S. aureus*.

En biofilm seul, *S. aureus* colonise la surface en premier avec un log max égale 7.5 à 48h suivi par une croissance tardive de *P. aeruginosa*, à 72h comme le montre la **Figure 26**.

Le biofilm de *S. aureus* cultivé, avec *P. aeruginosa*, a accumulé une masse de biofilm significativement plus élevée qu'après 72h par rapport au biofilm de *S. aureus* seul où il atteint un maximum de cellules après 48h. Inversement, les biofilms de *P. aeruginosa* inoculés avec *S. aureus* comme colonisateur secondaire n'ont pas montré d'augmentation significative de la masse du biofilm par rapport au biofilm mono-espèce de *P. aeruginosa* (**Figure 26**). Ceci suggère à notre avis des interactions à la fois compétitives et mutuelles entre *S. aureus* et *P. aeruginosa* au cours de la formation du biofilm mixte. L'établissement du biofilm où *P. aeruginosa* perturbe directement le biofilm immature de *S. aureus*, mais une fois qu'il est lui-même établi, il ralentit l'attachement secondaire de *P. aeruginosa* en biofilm mixte.

En outre, ces données soutiennent les observations cliniques selon lesquelles, les personnes qui sont pré-colonisées par *S. aureus* ont une plus grande prédisposition à une infection secondaire par *P. aeruginosa* [(Ahlgren et al., 2015) ; (Limoli et al., 2016)].

En général, les espèces bactériennes à Gram négatif et *S. aureus* interagissaient de façon concurrentielle. Les bactéries à Gram négatif testées sont mieux développées dans les biofilms mixtes de deux espèces. En revanche, la croissance des biofilms de *S. aureus* était réduite lorsqu'ils étaient cultivés dans des biofilms avec *Pseudomonas aeruginosa*. Tandis qu'avec les autres espèces il se développe mieux en biofilm, particulièrement aux premières 24h.

Il existe plusieurs études concernant la formation de duels biofilms de *Staphylococcus aureus* avec des bactéries à Gram négatif. Une relation de concurrence et compétition a été observée entre *S. aureus* et *E. coli*, dans lesquels le nombre des cellules viables de *S. aureus* dans les biofilms a diminué lors de la présence de *E. coli* (Millezi et al., 2012).

Ces auteurs ont suggéré que *E. coli* pourrait être plus important en raison du temps de génération plus court de cette bactérie, ce qui pourrait lui permettre de développer et de maintenir sa domination (Millezi et al., 2012).

Ce résultat, on le retrouve dans notre étude avec *Klebsiella pneumoniae* (Figure 27) où on constate que cette dernière évolue très bien avec des taux maximaux et cela qu'elle soit seule ou en présence du *Staphylococcus aureus*. Contrairement au *S. aureus* seule ou mixte, *S. aureus* se développe mieux en biofilm mixte.

Dans les biofilms de *S. aureus* avec les bactéries à Gram négative testées, le *S. aureus* produit des nucléases qui inhibent la multiplication initiale des autres bactéries testées à l'exception de l'espèce *P. aeruginosa* qui est connue par sa production de plusieurs substances au sein du biofilm à savoir les rhamnolipides inhibant *S. aureus* par l'intervention au niveau de la phase initiale de formation de biofilm (Quin et al., 2009). Résultat confirmé par notre histogramme (Figure 26) où on remarque une diminution de nombre de *S. aureus* à 48h contrairement à *Pseudomonas aeruginosa*, où le nombre de bactéries a augmenté de 1 log.

Acinetobacter baumannii et *Staphylococcus aureus* mis ensemble vivent en compétition avec des chiffres maximaux presque identiques au bout de 72h soit respectivement de 7.76 et de 7.64 contrairement à leurs croissance seules.

Les **Figures 24, 25** montrent que, dans les biofilms mixtes, les espèces *S. aureus*, *E. cloacae* et *A. baumannii* diminuent en nombre à 96h. Tandis que *P. aeruginosa* et *Klebsiella pneumoniae* (**Figures 26, 27**) ne varient pas significativement où leur nombre reste stable et élevée dans le biofilm (6,9 et 7,6 respectivement).

Cette élévation en nombre de bactéries (*Klebsiella* et *Pseudomonas*) est expliquée par le quorum sensing ou par la production du mannose riche en polysaccharides altérant la formation des biofilms de *S. aureus* et favorisant la formation de la capsule chez *K. pneumoniae* [(Schembri et Klemm, 2003) ; (Yang et al., 2011) ; (Chhibber et al., 2015) ; (Amos et al., 2019)].

Une autre raison possible expliquant l'augmentation du nombre de *P. aeruginosa* est la production de facteur de virulence extracellulaire par *Pseudomonas aeruginosa* N-acyl-homosérine-lactone qui régule négativement la formation de biofilm de *S. aureus* en biofilm mixte (Branda et al., 2005).

Elias et Banin (2012) ; Rendueles et Ghigo, (2012) estiment que les interactions entre les cellules influencent l'organisation temporelle et spatiale de l'architecture de biofilm et peuvent être classés comme coopératifs ou compétitifs.

Il est largement admis et connu qu'il existe des différences dans la capacité à former un biofilm et peut apparaître au sein de la même espèce. Certaines souches peuvent présenter une dynamique de biofilm différente que d'autres souches et ceci pour une meilleure adaptation au stress environnemental et nutritionnel (Chhibber et al., 2015).

Les différences dans les capacités de former un biofilm entre les différentes souches impliquent que l'extrapolation en réalité des résultats obtenus dans cette étude ne pourrait pas être aussi simple. Il est important de garder à l'esprit l'importance de comprendre la dynamique des biofilms et les caractéristiques de chaque population à chaque situation et temps spécifique étudiés.

9. Evolution des cultures en biofilms mixtes par la méthode du cristal violet.

La formation de biofilm en microplaque est sans doute la méthode la plus utilisée dans le monde. Simple à mettre en œuvre, ne nécessitant aucun équipement spécifique, elle permet le passage d'un grand nombre de souches et est adaptée au criblage de molécules anti-biofilm.

Les colorants généralement utilisés sont cationiques et se fixent sur l'ensemble des charges négatives des constituants, provenant aussi bien des bactéries que de la matrice, et ne permettent donc pas la différenciation entre les deux. L'étude de biofilm par la méthode du cristal violet ne reflète pas le nombre réel de bactéries en biofilm, puisqu'elle mesure le biofilm entier (cellules et matrice exopolymérique).

D'après les **Figures (30, 31, 32, 33)** ci-dessous, les densités optiques mesurées des biofilms composés d'une bactérie à Gram négatif et *Staphylococcus aureus* et supérieure à celles mesurées d'un biofilm composé d'une bactérie Gram négatif et *Staphylococcus epidermidis*. À l'exception des biofilms de *Staphylococcus aureus* et *S. epidermidis* avec *Pseudomonas aeruginosa* où les densités optiques mesurées à 48 heures 72 heures et 96 heures sont proches.

Les densités optiques des biofilms mixtes ont une même allure c'est-à-dire ils comportent trois parties à savoir descendant, ascendant, descendant. Cette allure des graphes, presque identique à celle retrouvée dans une étude similaire de **Makovcova et al., en 2017**. Cette allure peut être expliquée par le cycle d'un biofilm attachement réversible, adhésion irréversible, croissance et détachement.

La technique du cristal violet n'est pas précise dans la détermination du biofilm, elle détermine tout le biofilm (l'ensemble de cellules et matrice exopolysaccharidique). Les biofilms se différencient d'une espèce à l'autre, certains présentent de matrice exopolysaccharidique épaisse qui enveloppe plusieurs cellules, tandis que dans d'autres types de biofilm, une fine couche d'EPS tapisse les cellules (**Makovcova et al., 2017**). Aussi la densité bactérienne au sein de biofilms est différente, pour certains on trouve des biofilms très condensés en cellules et pour d'autres on trouve un faible nombre de cellules.

La biomasse totale du biofilm pourrait être sous-estimée lorsqu'une simple coloration au cristal violet est utilisée dans la détermination du biofilm (**Kamimura et al., 2022**). Le volume total de biomasse était diminué dans ces biofilms bi-espèces après 24h puis, elle augmente après 48h. Ces résultats ont indiqué une relation de compétition entre les bactéries, une idée qui est soutenue par les données de dénombrement en UFC/cm² obtenues.

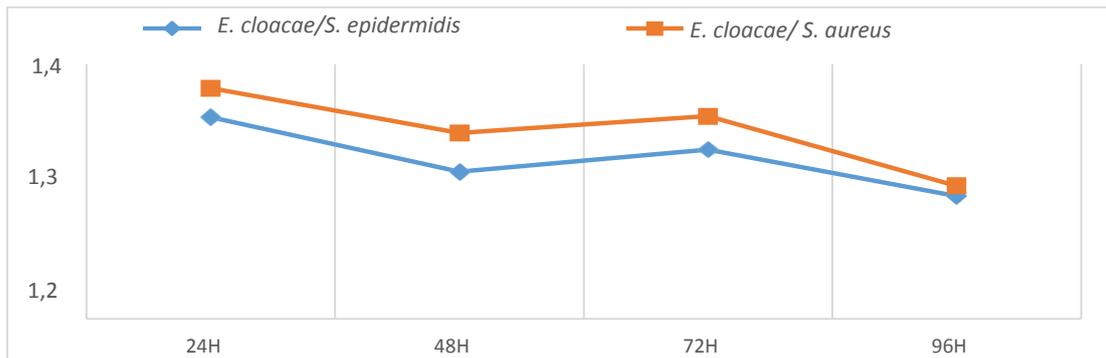


Figure 30 : Densité optique de biofilms mixtes d'*E. cloacae/S. aureus* et *E. cloacae/S. epidermidis*.

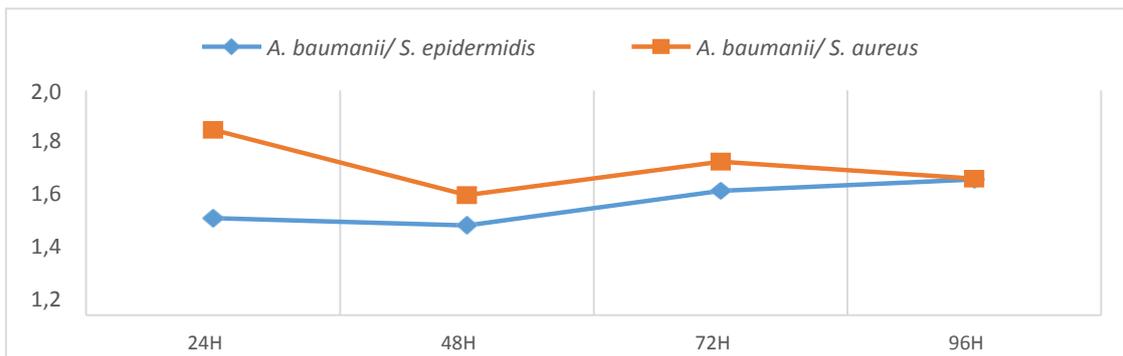


Figure 31 : Densité optique de biofilms mixtes d'*A. baumannii/S. aureus* et *A. baumannii/S. epidermidis*.

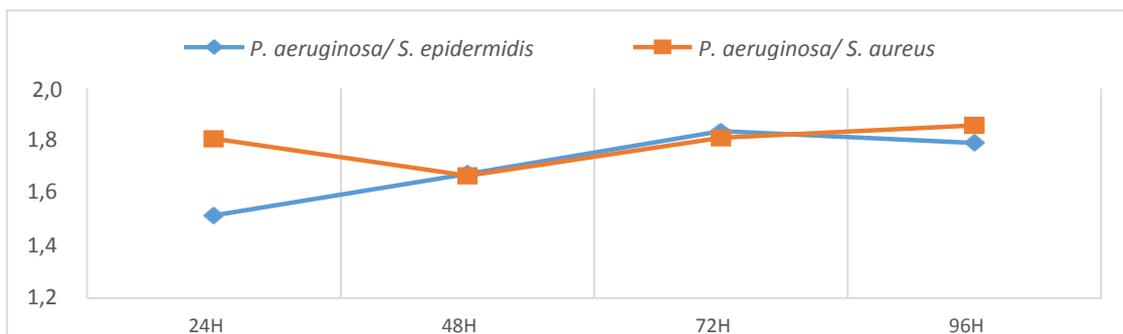


Figure 32 : Densité optique de biofilms mixtes de *P. aeruginosa/S. aureus* et *P. aeruginosa/S. epidermidis*.

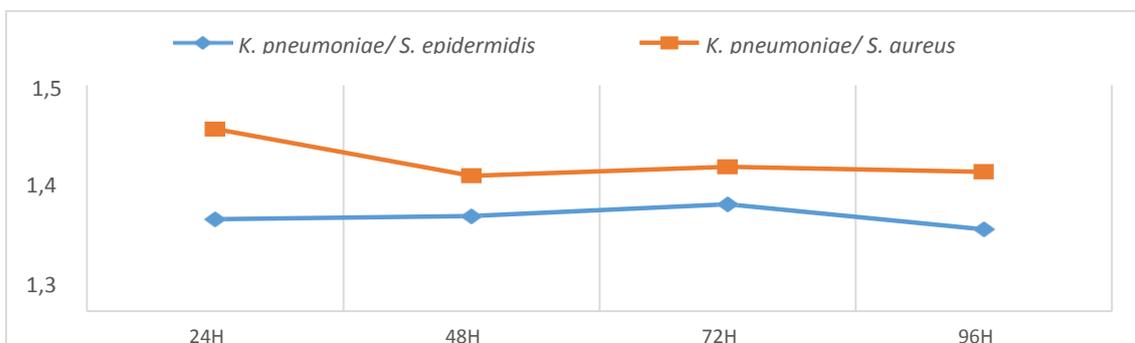


Figure 33 : Densité optique de biofilms mixtes de *K. pneumoniae/S. aureus* et *K. pneumoniae/S. epidermidis*.

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

La qualité de l'eau de dialyse est un facteur critique pour la sécurité et le bien-être des patients en dialyse. Les impuretés dans l'eau peuvent avoir un impact négatif sur la santé de ces patients. Les contaminants courants dans l'eau de dialyse comprennent les bactéries, les endotoxines, les particules, les métaux et les produits chimiques.

Suite aux résultats de cette étude, nous constatons que l'eau prélevée à la boucle de distribution dans l'unité d'hémodialyse du CHU de Tlemcen est amplement contaminée avec des taux bactériens variant de 90 à 150 UFC/mL avec une moyenne de 118 UFC/mL. Plus inquiétant, l'eau à l'entrée des machines de dialyse présentait des taux bactériens supérieurs, variant de 143 à 220 UFC/mL avec une moyenne de 182 UFC/mL la classant comme une eau plus souillée est inadéquate selon les normes de la pharmacopée européenne qui sont au maximum 100 UFC/mL.

Les directives de qualité de l'eau ont été établies pour garantir une eau de dialyse exempte de contaminants nocifs. Les réglementations varient selon les pays les organismes de santé, mais toutes, visent à protéger les patients dialysés, les différences entre ces standards en matière de la qualité microbiologique restent un point discutable qui favorise beaucoup de déviation. En particulier pour les normes microbiologiques, doivent être strictes et uniformes.

Une désinfection efficace et complète des machines d'hémodialyse reste difficile en raison de leur complexité et les contraintes de résistance des matériaux aux désinfectants. Les bactéries sont retenues et peuvent proliférer dans de nombreux composants du circuit hydraulique, en particulier dans les zones d'écoulement stagnant, formant de véritables biofilms, où leur éradication serait très difficile.

Ce constat a été confirmé dans notre étude, vu que les dénombrements des bactéries adhérentes (biofilm) sur 1 cm^2 sont préoccupants avec des taux allant de 4,30 jusqu'aux 6,74 Log UFC au cm^2 seulement. Alors que serait-il sur toute la longueur du circuit hydraulique qui fait 1 mètre de long ? Un chiffre énorme nécessite un acte immédiat. Ce niveau élevé de contamination présente un vrai danger pour la santé des patients dialysés.

Il est donc indispensable de prendre des mesures pour prévenir la formation de biofilms dans les tubulures de dialyse, où des protocoles de désinfection, de nettoyage appropriés, et d'une surveillance régulière de la qualité de l'eau et la présence de biofilms sont nécessaires et indispensables.

L'écologie microbienne au niveau du circuit hydraulique varie d'un système de production d'eau à un autre en raison des différences de source d'eau, de l'état d'hygiène des réservoirs et des traitements de désinfection. Les analyses microbiologiques de l'eau de dialyse (boucle et générateurs) ont mis en évidence la présence de bactéries, telles que les *Bacillus*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Acinetobacter* et *Staphylococcus*.

Les *Bacillus* sont majoritaires 52% et suivis par *Enterobacter cloacae* 23,52%. L'eau de la boucle et à l'entrée des machines de dialyse présentent des espèces identiques à l'exception d'une souche d'*Acinetobacter baumannii* isolée de l'eau à l'entrée de la machine M9. Les espèces identifiées dans les biofilms des tubulures sont essentiellement les *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas* et *Enterobacter* et deux souches de *Klebsiella oxytoca*. Il serait donc important de surveiller régulièrement la qualité de l'eau de dialyse et de maintenir des protocoles de maintenance et de désinfection pour minimiser le risque de biofilms microbiens multirésistants surtout que 34% de souches étaient résistantes au désinfectant utilisé à la concentration recommandée par le fournisseur.

La présente étude confirme que l'eau de la boucle et celle de l'entrée des machines de dialyse constituent une source d'infection de diverses espèces de bactéries à Gram négatif et positifs qui affichent non seulement une multirésistance aux désinfectants utilisés, mais également 55% des bactéries étaient confirmées bonnes formatrices de biofilm par tests spécifiques (TCP) et par microscopie électronique à balayage.

Ces bactéries n'étaient généralement pas retrouvées en mono espèce sur tubulure d'eau, elles formaient le plus souvent des biofilms mixtes.

La formation de biofilms mixtes impliquant plusieurs espèces de bactéries est un phénomène complexe et difficile à gérer. Les biofilms mixtes peuvent entraîner des problèmes de santé plus graves pour les patients en dialyse, car ils peuvent être plus résistants aux traitements de désinfection que les biofilms mono-espèce.

Tout en essayant de reproduire à travers notre étude ces biofilms mixtes, nous déduisons que c'est un phénomène très difficile à gérer. Comprendre comment les différentes espèces de bactéries interagissent les unes avec les autres est très complexe. Les résultats d'essais de combinaisons de biofilms entre deux espèces ont montré que chaque biofilm se comporte différemment où on pouvait assister soit à des effets synergétiques entre certaines espèces, ou alors à des effets antagonistes entre d'autres.

Les avancées dans les domaines tels que la génomique, la protéomique et la métagénomique peuvent aider à mieux comprendre la composition des biofilms mixtes, ce qui pourrait conduire à des traitements plus ciblés et éradication totale de ce problème du biofilm dans les unités de dialyse.

Par conséquent, il convient de souligner les dangers et risques de rejet d'endotoxines à partir d'un biofilm bactérien adhérent sur des tubulures d'eau reliées aux machines, agissant comme un réservoir de contamination continue. Les efforts visant à optimiser les procédures de nettoyage et de désinfection utilisées pour les systèmes d'hémodialyse devraient viser à détacher et neutraliser le biofilm si nécessaire.

Il est donc primordial de maintenir des protocoles de désinfection et de nettoyage appropriés pour les équipements de dialyse et de surveiller régulièrement la qualité de l'eau et la présence de biofilms. L'utilisation de techniques de désinfection plus avancées et innovantes et les avancées dans la recherche sur les biofilms sont capitales pour gérer de tels problèmes.

En perspectives de ce travail sur la qualité microbiologique de l'eau de dialyse, il serait souhaitable :

1. d'analyser la composition microbienne et le taux d'endotoxines dans l'eau de dialyse à différents stades de production et de distribution de l'eau pour identifier les sources potentielles de contamination ;
2. d'évaluer l'impact des biofilms sur la qualité microbiologique de l'eau de dialyse et sur la performance des membranes de dialyse.
3. d'évaluer l'efficacité de différentes méthodes de désinfection pour réduire la charge bactérienne dans l'eau de dialyse.
4. d'établir des normes microbiologiques plus strictes pour l'eau de dialyse en tenant compte des spécificités de chaque système de production.
5. d'étudier l'impact à long terme de l'exposition à des taux élevés de bactéries dans l'eau de dialyse sur la santé des patients.
6. d'établir des programmes de formation pour le personnel des centres de dialyse en matière de contrôle des infections et de maintenance de la qualité de l'eau de dialyse.

En perspectives des biofilms mixtes on note :

1. l'étude de leur composition pour comprendre les interactions entre les différentes espèces bactériennes ;
2. l'évaluation des méthodes de détection et de quantification, pour développer des méthodes plus sensibles et spécifiques ;
3. l'étude de l'impact des conditions environnementales sur leur formation, résistance et croissance ;
4. l'étude de leur impact sur la santé humaine, afin de prévenir et traiter les infections associées. Ces perspectives peuvent aider à mieux comprendre les biofilms mixtes et à développer des stratégies efficaces pour lutter contre les infections associées à ces biofilms.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

1. **AAMI Standard and Recommendation Practices. (2000).** AAMI/DS-1 RD62. Water treatment equipment for hemodialysis applications. Association for the Advancement of Medical Instrumentation. Arlington, VA, USA, 2–32.
2. **Abbass, A. A., El-Koraie, A. F., Hazzah, W. A., Omran, E. A., & Mahgoub, M. A. (2018).** Microbiological monitoring of ultrapure dialysis fluid in a hemodialysis center in Alexandria, Egypt. *Alexandria journal of medicine*, 54(4), 523-527.
3. **Abel, J. J., Rowntree, L. G., & Turner, B. B. (1913).** On the removal of diffusible substances from the circulating blood by means of dialysis. *Trans Assoc Am Physicians*, 28, 51.
4. **Abualhasan, M., Basim, A., Salahat, A., Sofan, S., & Al-Atrash, M. (2018).** Quality of water used in Palestinian hemodialysis centers. *Public Health*, 165, 136–141. <https://doi.org/10.1016/j.puhe.2018.09.015>.
5. **Agar, J. W. (2015).** Reusing and recycling dialysis reverse osmosis system reject water. *Kidney international*, 88(4), 653-657.
6. **Agnid, H., Habib, X. (2018).** Support au service biomédical pour la conception d'une structure de dialyse : Réglementations et bonnes pratiques en hygiène. Lien internet : Index of /~mastermq/extranets/etu/M2_QPO_etu/QPO12/2017-2018/travaux etuants / qpo 12_2018 _gr01_dialyse/web
7. **Ahlgren HG, Benedetti A, Landry JS et al. (2015).** Clinical outcomes associated with *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* airway infections in adult cystic fibrosis patients. *BMC Pulm Med*;15:67
8. **Ahmad, S. (2005).** Essentials of water treatment in hemodialysis. *Hemodialysis International*, 9(2), 127–134 <https://doi.org/10.1111/j.1492-7535.2005.01124.x>.
9. **Allard, B. (2004).** Les chloramines en hémodialyse. *Journal de l'association des techniciens de dialyse*, vol. 22. <https://dialyse.asso.fr/n22-juin-2004/>
10. **Alter MJ, Tokars JI, Arduino MJ, Favero MS. (2004).** Control of infections associated with hemodialysis. In Mayhall CJ (ed) Hospital epidemiology and infection control, 3 rd edn. Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, pp 1139 – 1160
11. **Alves, P. M., Al-Badi, E., Withycombe, C., Jones, P. M., Purdy, K. J., & Maddocks, S. E. (2018).** Interaction between *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*

- is beneficial for colonisation and pathogenicity in a mixed biofilm. *Pathogens and Disease*, 76(1). <https://doi.org/10.1093/femspd/fty003>
12. **Amos-Tautua, B. M., Songca, S. P., & Oluwafemi, O. S. (2019).** Application of porphyrins in antibacterial photodynamic therapy. *Molecules*, 24(13), 2456.
 13. **Anversa, L., Romani, C. D., Caria, E. S., Saeki, E. K., Nascentes, G. A., Garbelotti, M., ... & Richini-Pereira, V. B. (2022).** Quality of dialysis water and dialysate in haemodialysis centres: Highlight for occurrence of non-fermenting gram-negative bacilli. *Journal of Applied Microbiology*, 132(4), 3416-3429.
 14. **Armbruster, C. R., Wolter, D. J., Mishra, M., Hayden, H. S., Radey, M. C., Merrihew, G., MacCoss, M. J., Burns, J., Wozniak, D. J., Parsek, M. R., & Hoffman, L. R. (2016).** *Staphylococcus aureus* Protein A Mediates Interspecies Interactions at the Cell Surface of *Pseudomonas aeruginosa*. *MBio*, 7(3). <https://doi.org/10.1128/mbio.00538-16>
 15. **Bamba, T., R. Matsui, and K. Watabe. (1996).** Effect of steam-heat treatment with/without divalent cations on the inactivation of lipopolysaccharides from several bacterial species. *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* 50:129-135
 16. **Beloin, C., Valle, J., Latour-Lambert, P., Faure, P., Kzreminski, M., Balestrino, D., Haagensen, J. A. J., Molin, S., Prensier, G., Arbeille, B., & Ghigo, J. M. (2004).** Global impact of mature biofilm lifestyle on *Escherichia coli* K-12 gene expression. *Molecular Microbiology*, 51(3), 659–674. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03865.x>
 17. **Bolasco, P. (2020).** The production of on-line dialysis water for extracorporeal dialysis: proposals for an increased safety upgrade: a viewpoint. *Journal of Nephrology*, 33, 405-415.
 18. **Borges, C., Lascowski, K., Filho, N., & Pelayo, J. (2007).** Microbiological quality of water and dialysate in a haemodialysis unit in Ponta Grossa-PR, Brazil. *Journal of Applied Microbiology*, 103(5), 1791–1797. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03431.x>
 19. **Branda, S. S., Vik, Å., Friedman, L., & Kolter, R. (2005).** Biofilms: the matrix revisited. *Trends in microbiology*, 13(1), 20-26.

20. **Brandon P, Jennings MC, LaPlante KL, et al. (2013).** *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus epidermidis* co-infection promotes proliferation and antibiotic resistance of *S. epidermidis* within polymicrobial biofilms. *Front Microbiol.* 4:161.
21. **Burmølle, M., Webb, J. S., Rao, D., Hansen, L. H., Sørensen, S. J., & Kjelleberg, S. (2006).** Enhanced Biofilm Formation and Increased Resistance to Antimicrobial Agents and Bacterial Invasion Are Caused by Synergistic Interactions in Multispecies Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(6), 3916–3923. <https://doi.org/10.1128/aem.03022-05>
22. **Caiazza, N. C., & O’Toole, G. A. (2004).** Sldb is required for the transition from reversible to irreversible attachment during biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* pa14. *journal of bacteriology*, 186(14), 4476–4485. <https://doi.org/10.1128/jb.186.14.4476-4485.2004>
23. **Canaud, B. (2009).** Principes et modalités d’application de l’hémodialyse au traitement de l’insuffisance rénale chronique. *Néphrologie & Thérapeutique*, 5(3), 218–238. <https://doi.org/10.1016/j.nephro.2009.02.002>
24. **Cappelli, G., Ballestri, M., Perrone, S., Ciuffreda, A., Inguaggiato, P., & Albertazzi, A. (2000).** Biofilms invade nephrology: effects in hemodialysis. *Blood Purification*, 18(3), 224-230.
25. **Ceri, H., Olson, M. E., Stremick, C., Read, R. R., Morck, D., & Buret, A. (1999).** The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *Journal of clinical microbiology*, 37(6), 1771-1776.
26. **Chaudry, M. S., Gislason, G. H., Kamper, A. L., Rix, M., Larsen, A. R., Petersen, A., ... & Bruun, N. E. (2019).** Increased risk of *Staphylococcus aureus* bacteremia in hemodialysis—A nationwide study. *Hemodialysis International*, 23(2), 230-238.
27. **Chhibber, S., Bansal, S., & Kaur, S. (2015).** Disrupting the mixed-species biofilm of *Klebsiella pneumoniae* B5055 and *Pseudomonas aeruginosa* PAO using bacteriophages alone or in combination with xylitol. *Microbiology*, 161(Pt_7), 1369-1377.
28. **Chmielewski, R., & Frank, J. (2003).** Biofilm Formation and Control in Food Processing Facilities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2(1), 22–32. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2003.tb00012.x>

29. **Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, Baddour LM, Barrett FF, Melton DM, et al. (1985).** Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol.* ;22:996–1006.
30. **Chuasuwana A, Pooripussarakul S, Thakkinstian A, Ingsathit A, & Pattanapruteep O. (2020).** Comparisons of quality of life between patients underwent peritoneal dialysis and hemodialysis: a systematic review and meta-analysis. *Health and quality of life outcomes, 18*, 1-11.
31. **Coenye, T., Kjellerup, B., Stoodley, P., & Bjarnsholt, T. (2020).** The future of biofilm research—Report on the ‘2019 Biofilm Bash’. *Biofilm, 2*, 100012.
32. **Cooper R, Okhiria O. (2006).** Biofilms, wound infection and the issue control. *Wounds UK. 2*: 48-57.
33. **Costerton, J. (1999).** Introduction to biofilm. *International Journal of Antimicrobial Agents, 11*(3–4), 217–221. [https://doi.org/10.1016/s0924-8579\(99\)00018-7](https://doi.org/10.1016/s0924-8579(99)00018-7)
34. **Coulliette, A. D., & Arduino, M. J. (2013).** Hemodialysis and Water Quality. *Seminars in Dialysis, 26*(4), 427–438. <https://doi.org/10.1111/sdi.12113>
35. **Dadgari, A., Dadvar, L., & Eslam-Panah, H. (2015).** Multidimensional fatigue syndrome and dialysis adequacy among elderly patients under hemodialysis treatment. *International Journal of Health Studies, 1*(2), 5-8.
36. **Daugirdas, J. T. (2000).** Dialysis adequacy and kinetics. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension, 9*(6), 599–605. <https://doi.org/10.1097/00041552-200011000-00003>.
37. **Davey, M. E., & O'toole, G. A. (2000).** Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and molecular biology reviews, 64*(4), 847-867.
38. **Delville, P. H. (2021).** Nage bactérienne et émergence de mouvements collectifs (Doctoral dissertation, Université Paris-Saclay).
39. **Diaz-Buxo, J. A., White, S. A., & Himmele, R. (2013).** The importance of residual renal function in peritoneal dialysis patients. In *Advances in Peritoneal dialysis. Conference on Peritoneal Dialysis* (Vol. 29, pp. 19-24).

40. Ducki, S., Francini, N., & Blech, M. F. (2005). Water used for hemodialysis equipment: where is *Pseudomonas aeruginosa*?. *Nephrologie & Therapeutique*, 1(2), 126-130.
41. Eaton, D. C., & Pooler, J. P. (2009). Vander's renal physiology. *Mc Graw Hill Medicall*.
42. Ebrahimi, H., Sadeghi, M., Amanpour, F., & Dadgari, A. (2016). Influence of nutritional education on hemodialysis patients' knowledge and quality of life. *Saudi Journal of Kidney Diseases and Transplantation*, 27(2), 250.
43. Ehlers, G.A.C. and Turner, S. (2012). Biofilms in wastewater treatment systems. In *Microbial Biofilms - Current Research and Applications* (Lear, G. and Lewis, G., eds), pp. 99–110, *Caister Academic Press*
44. Elias, S., & Banin, E. (2012). Multi-species biofilms: Living with friendly neighbors. *FEMS Microbiology Reviews*, 36(5), 990–1004. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2012.00325.x>
45. **European Pharmacopeia, 3rd edn, Supplement 2001**: Monograph 1997: 1167 corrected 2000. Haemodialysis solutions, concentrated, water for diluting
46. Favero, M. S. (1974). Microbial contamination of renal dialysis systems and associated health risks. *Trans. Am. Soc. Artif. Organs*, 20, 175-183.
47. Filloux, A., & Vallet, I. (2003). Biofilm : mise en place et organisation d'une communauté bactérienne. *Médecine/Sciences*, 19(1), 77–83. <https://doi.org/10.1051/medsci/200319177>
48. Flemming, H. C., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 8(9), 623–633. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>
49. Fuqua, C., & Greenberg, E. P. (2002). Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3(9), 685–695. <https://doi.org/10.1038/nrm907>
50. Fux, C., Costerton, J., Stewart, P., & Stoodley, P. (2005). Survival strategies of infectious biofilms. *Trends in Microbiology*, 13(1), 34–40. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2004.11.010>

51. **Gaibor, N. G. T., Sacaluga, L. G., de la Cerda Ojeda, F., Cotén, J. R. M., & Lazo, M. S. (2019).** Thermal disinfection in hemodialysis using the A0 concept as dispenser. *Nefrología (English Edition)*, 39(5), 482-488.
52. **Girndt, M., Köhler, H., Schiedhelm-Weick, E., Schlaak, J. F., Meyer Zum Büschenfelde, K. H., & Fleischer, B. (1995).** Production of interleukin-6, tumor necrosis factor α and interleukin-10 in vitro correlates with the clinical immune defect in chronic hemodialysis patients. *Kidney International*, 47(2), 559–565. <https://doi.org/10.1038/ki.1995.70>
53. **Glorieux, G., Neiryck, N., Veys, N., & Vanholder, R. (2012).** Dialysis water and fluid purity: more than endotoxin. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 27(11), 4010–4021. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfs306>
54. **Glorious, G., Neiryck, N., Veys, N., & Vanholder, R. (2012).** Dialysis water and fluid purity: more than endotoxin. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 27(11), 4010–4021.
55. **Gomila, M., Gascó, J., Gil, J., Bernabeu, R., Iñigo, V., & Lalucat, J. (2006).** A molecular microbial ecology approach to studying hemodialysis water and fluid. *Kidney International*, 70(9), 1567–1576. <https://doi.org/10.1038/sj.ki.5001756>
56. **Gounon .F (2003).** Infections nosocomiales et générateurs d'hémodialyse. *Echange de la FIDTN*, 66 : 46-48
57. **Grynfogel, A. B. (2005).** Bonnes pratiques d'hygiène en hémodialyse. *Revue officielle de la société française d'hygiène hospitalière* 12(2), 76-156
58. **Hall-Stoodley, L., Stoodley, P., Kathju, S., Høiby, N., Moser, C., William Costerton, J., Moter, A., & Bjarnsholt, T. (2012).** Towards diagnostic guidelines for biofilm-associated infections. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 65(2), 127–145. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695x.2012.00968.x>
59. **Hangler, M., Burmølle, M., Schneider, I., Allermann, K., & Jensen, B. (2009).** The serine protease Esperase HPF inhibits the formation of multispecies biofilm. *Biofouling*, 25(7), 667–674. <https://doi.org/10.1080/08927010903096008>
60. **Harriott, M. M., & Noverr, M. C. (2009).** *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* Form Polymicrobial Biofilms: Effects on Antimicrobial Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(9), 3914–3922. <https://doi.org/10.1128/aac.00657-09>

61. **Hoenich, N. A., Ronco, C., & Levin, R. (2006).** The Importance of Water Quality and Haemodialysis Fluid Composition. *Blood Purification*, 24(1), 11–18. <https://doi.org/10.1159/000089430>
62. **Holmes, C., Degremont, A., Kubey, W., Straka, P., & Man, N. (2004).** Effectiveness of Various Chemical Disinfectants versus Cleaning Combined with Heat Disinfection on *Pseudomonas* Biofilm in Hemodialysis Machines. *Blood Purification*, 22(5), 461–468. <https://doi.org/10.1159/000080791>
63. **Hotterbeekx, A., Kumar-Singh, S., Goossens, H., & Malhotra-Kumar, S. (2017).** In vivo and In vitro Interactions between *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus spp.* *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 7, 106.
64. **Humudat, Y. R., & Al-Naseri, S. K. (2020).** Evaluation of dialysis water quality at hospitals in Baghdad, Iraq. *Journal of Health & Pollution*, 10(28).
65. **Isakozawa, Y., Migita, H., & Takesawa, S. (2016).** Efficacy of Biofilm Removal From Hemodialysis Piping. *Nephro-Urology Monthly*, 8(5). <https://doi.org/10.5812/numonthly.39332>
66. **Jackson, B. M., Beck-Sague, C. M., Bland, L. A., Arduino, M. J., Meyer, L., & Jarvis, W. R. (1994).** Outbreak of pyrogenic reactions and gram-negative bacteremia in a hemodialysis center. *American journal of nephrology*, 14(2), 85-89.
67. **James, R. (2006).** Monitoring of dialysis water systems—is there a need for increased sampling?. *EDTNA-ERCA Journal*, 32(2), 74-77.
68. **Jass, J. et al. (2002).** Microbes and enzymes in biofilms. In *Enzymes in the Environment. Activity, Ecology and Applications* (Burns, R.G. and Dick, R.D., eds), pp. 307–326, Marcel Dekker
69. **Jefferson, K. K. (2004).** What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiology Letters*, 236(2), 163–173. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2004.tb09643.x>
70. **Journal officiel Algérien. (2002).** Normes techniques en infrastructures et en équipements du centre d'hémodialyse allégé de proximité 30,17-18
71. **Kamimura, R., Kanematsu, H., Ogawa, A., Kogo, T., Miura, H., Kawai, R., ... & Barry, D. M. (2022).** Quantitative Analyses of Biofilm by Using Crystal Violet Staining and Optical Reflection. *Materials*, 15(19), 6727.

72. **Karatan E, Watnick P. (2009).** Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiol Mol Biol Rev* ;73:310–347.
73. **Kawanishi, H., Moriishi, M., Takahashi, N., & Tsuchiya, S. (2016).** The central dialysis fluid delivery system (CDDS): is it specialty in Japan?. *Renal Replacement Therapy*, 2(1), 1-8.
74. **Kessler M, Canaud B, Pedrini La, Tatersall J, Ter Wee Pm, Vanholder M, Wanner C. (2002).** European Best Practice Guidelines for Haemodialysis. Dialysis fluid purity- Section IV. *Nephrol Dial Transplant*; 17(S7): 1-111.
75. **Kolenbrander, P. E., Palmer, R. J., Periasamy, S., & Jakubovics, N. S. (2010).** Oral multispecies biofilm development and the key role of cell–cell distance. *Nature Reviews Microbiology*, 8(7), 471–480. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2381>
76. **Korgaonkar, A., Trivedi, U., Rumbaugh, K. P., & Whiteley, M. (2012).** Community surveillance enhances *Pseudomonas aeruginosa* virulence during polymicrobial infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(3), 1059–1064. <https://doi.org/10.1073/pnas.1214550110>
77. **Lee, K. W. K., Periasamy, S., Mukherjee, M., Xie, C., Kjelleberg, S., & Rice, S. A. (2013).** Biofilm development and enhanced stress resistance of a model, mixed-species community biofilm. *The ISME Journal*, 8(4), 894–907. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.194>
78. **Lima, J. D. R. O., Marques, S. G., Gonçalves, A. G., Salgado Filho, N., Nunes, P. C., Silva, H. S., Monteiro, S. G., & Costa, J. M. L. (2005).** Microbiological analyses of water from hemodialysis services in São Luís, Maranhão, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 36(2),103-108. <https://doi.org/10.1590/s1517-83822005000200001>
79. **Limoli DH, Yang J, Khansaheb MK et al. (2016).** *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* co-infection is associated with cystic fibrosis-related diabetes and poor clinical outcomes. *Eur J Clin Microbiol*.35:947–5
80. **Locatelli, F., Altieri, P., Andrulli, S., Bolasco, P., Sau, G., Pedrini, L. A., ... & Zoccali, C. (2010).** Hemofiltration and hemodiafiltration reduce intradialytic hypotension in ESRD. *Journal of the American Society of Nephrology*, 21(10), 1798-1807.

81. Mah, T. F. C., & O'Toole, G. A. (2001). Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in Microbiology*, 9(1), 34–39. [https://doi.org/10.1016/s0966-842x\(00\)01913-2](https://doi.org/10.1016/s0966-842x(00)01913-2)
82. Maher H, John F. (1989). *Replacement of Renal Function by Dialysis: A Textbook of Dialysis*. Springer Netherlands, p.20-74
83. Makovcova, J., Babak, V., Kulich, P., Masek, J., Slany, M., & Cincarova, L. (2017). Dynamics of mono-and dual-species biofilm formation and interactions between *Staphylococcus aureus* and Gram-negative bacteria. *Microbial biotechnology*, 10(4), 819-832.
84. Man, N. K., Degremont, A., Darbord, J. C., Collet, M., & Vaillant, P. (1998). Evidence of Bacterial Biofilm in Tubing from Hydraulic Pathway of Hemodialysis System. *Artificial Organs*, 22(7), 596–600. <https://doi.org/10.1046/j.1525-1594.1998.06195.x>
85. Man, N. K., Touam, M., & Jungers, P. (2010). *L'hémodialyse de suppléance* (FLAMMARION MEDECINE-SCIENCE ed.). LAVOISIER MSP. P 17
86. Mangwani, N., Kumari, S., & Das, S. (2016). Bacterial biofilms and quorum sensing: fidelity in bioremediation technology. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 32(1-2), 43-73.
87. Marion-Ferey, K., Pasmore, M., Stoodley, P., Wilson, S., Husson, G., & Costerton, J. (2003). Biofilm removal from silicone tubing: an assessment of the efficacy of dialysis machine decontamination procedures using an in vitro model. *Journal of Hospital Infection*, 53(1), 64–71. <https://doi.org/10.1053/jhin.2002.1320>
88. Matz, C., & Kjelleberg, S. (2005). Off the hook – how bacteria survive protozoan grazing. *Trends in Microbiology*, 13(7), 302–307. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2005.05.009>
89. Mcgregor, E., Stewart, G., Rodger, R. S. C., & Jardine, A. G. (2000). Early echocardiographic changes and survival following renal transplantation. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 15(1), 93-98.
90. Millezi, F., Pereira, M., Batista, N., Camargos, N., Auad, I., Cardoso, M., & PICCOLI, R. (2012). Susceptibility of monospecies and dual-species biofilms of

staphylococcus aureus and *escherichia coli* to essential oils. *Journal of Food Safety*, 32(3), 351–359. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4565.2012.00387.x>

91. **Mineshima, M. (2015)**. The past, present and future of the dialyzer. In *Chronic Kidney Diseases-Recent Advances in Clinical and Basic Research* (Vol. 185, pp. 8-14). Karger Publishers.
92. **Mineshima, M., Takahashi, S., Tomo, T., Kawanishi, H., Kawaguchi, H., Minakuchi, J. & Itami, N. (2019)**. A clinical significance of intermittent infusion hemodiafiltration using backfiltration of ultrapure dialysis fluid compared to hemodialysis: a multicenter randomized controlled crossover trial. *Blood Purification*, 48(4), 368-381.
93. **Monardo, P., Lacquaniti, A., Campo, S., Bucca, M., Casuscelli di Tocco, T., Rovito, S., ... & Santoro, A. (2021)**. Updates on hemodialysis techniques with a common denominator: The personalization of the dialytic therapy. In *Seminars in dialysis* (Vol. 34, No. 3, pp. 183-195).
94. **Monardo, P., Lacquaniti, A., Campo, S., Bucca, M., Casuscelli di Tocco, T., Rovito, S., ... & Santoro, A. (2021)**. Updates on hemodialysis techniques with a common denominator: The personalization of the dialytic therapy. In *Seminars in dialysis* (Vol. 34, No. 3, pp. 183-195).
95. **Morin, P. (2000)**. Identification of the bacteriological contamination of a water treatment line used for haemodialysis and its disinfection. *Journal of Hospital Infection*, 45(3), 218-224.
96. **Mouchet, P. (2000)**. *Traitement des eaux avant utilisation. Substances dissoutes*. Ed. Techniques Ingénieur.
97. **Nishimura, S., Tsurumoto, T., Yonekura, A., Adachi, K., & Shindo, H. (2006)**. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms isolated from infected total hip arthroplasty cases. *Journal of Orthopaedic Science*, 11(1), 46-50.
98. **Okunola, O. O., & Olaitan, J. O. (2016)**. Bacterial contamination of hemodialysis water in three randomly selected centers in South Western Nigeria. *Nigerian Journal of Clinical Practice*, 19(4), 491-495.

99. Oumokhtar, B., Lalami, A. E. O., Mahmoud, M., Berrada, S., Arrayhani, M., & Houssaini, T. S. (2013). Prevent infection linked to the dialysis water in a hemodialysis center in Fez city (Morocco). *The Pan African Medical Journal*, 16.
100. Pastar, I., Nusbaum, A. G., Gil, J., Patel, S. B., Chen, J., Valdes, J., Stojadinovic, O., Plano, L. R., Tomic-Canic, M., & Davis, S. C. (2013). Interactions of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* USA300 and *Pseudomonas aeruginosa* in Polymicrobial Wound Infection. *PLoS ONE*, 8(2), e56846. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056846>
101. Pastorella, G. et al. (2012). Biofilms : application in bioremediation. In *Microbial Biofilms - Current Research and Applications* (Lear, G. and Lewis, G., eds), pp. 73–98, Caister Academic Press
102. Payne, G. M., & Curtis, J. (2021). Water Treatment for Hemodialysis: Keeping Patients Safe. *Nephrology Nursing Journal*, 48(4), 315-345.
103. Pérez-García, R., & Rodríguez-Benítez, P. O. C. (2000). Why and how to monitor bacterial contamination of dialysate? *Nephrology Dialysis Transplantation*, 15(6), 760–764. <https://doi.org/10.1093/ndt/15.6.760>
104. Peters, B. M., Jabra-Rizk, M. A., Scheper, M. A., Leid, J. G., Costerton, J. W., & Shirtliff, M. E. (2010). Microbial interactions and differential protein expression in *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* dual-species biofilms. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 59(3), 493–503. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695x.2010.00710.x>
105. Phillips, G., Hudson, S., & Stewart, W. (1994). Persistence of microflora in biofilm within fluid pathways of contemporary haemodialysis monitors (Gambro AK-10). *Journal of Hospital Infection*, 27(2), 117–125. [https://doi.org/10.1016/0195-6701\(94\)90004-3](https://doi.org/10.1016/0195-6701(94)90004-3)
106. Pihl, M., Davies, J. R., Chávez de Paz, L. E., & Svensäter, G. (2010). Differential effects of *Pseudomonas aeruginosa* on biofilm formation by different strains of *Staphylococcus epidermidis*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 59(3), 439-446.
107. Pisani, B., Simões, M., Prandi, M. A. G., Rocha, M. M. M., Gonçalves, C. R., Vaz, T. M. I., & Irino, K. (2000). Outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia in a

- Hemodialysis Center in Campinas, São Paulo, Brazil. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, 59(1/2), 51-56.
108. **Pontoriero, G. (2003)**. The quality of dialysis water. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 18(90007), 21vii–25. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfg1074>
109. **Pourriat J, Martin C, et Ichai C, Theissen A, Grimaud D. (2004)**. hémodyalyse, hémofiltration. In. Principes de réanimation chirurgicale, Rueil Malmaison : Arnette, p. 180-195
110. **Qin, Z., Yang, L., Qu, D., Molin, S., & Tolker-Nielsen, T. (2009)**. *Pseudomonas aeruginosa* extracellular products inhibit staphylococcal growth, and disrupt established biofilms produced by *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology*, 155(7), 2148-2156.
111. **Quijano, G., Arcila, J. S., & Buitrón, G. (2017)**. Microalgal-bacterial aggregates: applications and perspectives for wastewater treatment. *Biotechnology Advances*, 35(6), 772-781.
112. **Reasoner, D. J. (2004)**. Heterotrophic plate count methodology in the United States. *International Journal of Food Microbiology*, 92 (3), 307–315. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2003.08.008>
113. **Ren, D., Bedzyk, L. A., Thomas, S. M., Ye, R. W., & Wood, T. K. (2004)**. Gene expression in *Escherichia coli* biofilms. *Applied microbiology and biotechnology*, 64, 515-524.
114. **Rendueles, O., & Ghigo, J. M. (2012)**. Multi-species biofilms: how to avoid unfriendly neighbors. *FEMS Microbiology Reviews*, 36 (5), 972–989. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2012.00328.x>
115. **Renner, L. D., & Weibel, D. B. (2011)**. Physicochemical regulation of biofilm formation. *MRS Bulletin*, 36(5), 347–355. <https://doi.org/10.1557/mrs.2011.65>
116. **Roberts, A. P., Cheah, G., Ready, D., Pratten, J., Wilson, M., & Mullany, P. (2001)**. Transfer of Tn 916-like elements in microcosm dental plaques. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 45(10), 2943-2946.
117. **Römling, U., Kjelleberg, S., Normark, S., Nyman, L., Uhlin, B. E., & Åkerlund, B. (2014)**. Microbial biofilm formation: a need to act. *Journal of internal medicine*, 276(2), 98-110.

118. Rosenthal, A. F., Griffin, J. S., Wagner, M., Packman, A. I., Balogun, O., & Wells, G. F. (2018). Morphological analysis of pore size and connectivity in a thick mixed-culture biofilm. *Biotechnology and Bioengineering*, 115(9), 2268-2279.
119. Roth, V. R., & Jarvis, W. R. (2000). Outbreaks of Infection and/or Pyrogenic Reactions in Dialysis Patients. *Seminars in Dialysis*, 13(2), 92–96. <https://doi.org/10.1046/j.1525-139x.2000.00027.x>
120. Rouillon, S., Ourdanabia, S., Jamart, S., Hernandez, C., & Meunier, O. (2006). Étude de l'efficacité d'un produit détergent désinfectant pour sols et surfaces sur les souches bactériennes isolées à partir de l'environnement hospitalier. *Pathologie Biologie*, 54(6), 325–330. <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2006.01.011>
121. Sauer, K., Camper, A. K., Ehrlich, G. D., Costerton, J. W., & Davies, D. G. (2002). *Pseudomonas aeruginosa* Displays Multiple Phenotypes during Development as a Biofilm. *Journal of Bacteriology*, 184(4), 1140–1154. <https://doi.org/10.1128/jb.184.4.1140-1154.2002>
122. Sauer, K., Cullen, M. C., Rickard, A. H., Zeff, L. A. H., Davies, D. G., & Gilbert, P. (2004). Characterization of nutrient-induced dispersion in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm. *Journal of bacteriology*, 186(21), 7312-7326.
123. Schembri, M. A., Kjaergaard, K., & Klemm, P. (2003). Global gene expression in *Escherichia coli* biofilms. *Molecular Microbiology*, 48(1), 253–267. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03432.x>
124. Schiavano, G. F., Parlani, L., Sisti, M., Sebastianelli, G., & Brandi, G. (2014). Occurrence of fungi in dialysis water and dialysate from eight haemodialysis units in central Italy. *Journal of Hospital Infection*, 86(3), 194-200.
125. Schilcher, K., & Horswill, A. R. (2020). Staphylococcal biofilm development: structure, regulation, and treatment strategies. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 84(3), e00026-19.
126. Schwering, M., Song, J., Louie, M., Turner, R. J., & Ceri, H. (2013). Multi-species biofilms defined from drinking water microorganisms provide increased protection against chlorine disinfection. *Biofouling*, 29(8), 917–928. <https://doi.org/10.1080/08927014.2013.816298>

127. Serra, R., Grande, R., Butrico, L., Rossi, A., Settimio, U. F., Caroleo, B., ... & De Franciscis, S. (2015). Chronic wound infections: the role of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Expert review of anti-infective therapy*, 13(5), 605-613.
128. Shafi, T., Wilson, R. F., Greer, R., Zhang, A., Sozio, S., Tan, M., & Bass, E. B. (2020). End-stage renal disease in the Medicare population: frequency and duration of hemodialysis and quality of life assessment.
129. Shawn, A. Y. K., Sudigdoadi, S., & Dhianawaty, D. (2019). Biofilm Formation in Reverse Osmosis Water at Hemodialysis Units in Two Hospitals Bandung. *Althea Medical Journal*, 6(3), 136-139.
130. Shinoda, T. (2004). 'Clean Dialysate' Requires Not Only Lower Levels of Endotoxin but Also Sterility of Dilution Water. *Blood Purification*, 22(2), 78–80. <https://doi.org/10.1159/000081880>
131. Shirliff, M. E., Peters, B. M., & Jabra-Rizk, M. A. (2009). Cross-kingdom interactions: *Candida albicans* and bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 299(1), 1–8. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01668.x>
132. Simoes-Silva, L., Araujo, R., Pestana, M., Soares-Silva, I., & Sampaio-Maia, B. (2018). The microbiome in chronic kidney disease patients undergoing hemodialysis and peritoneal dialysis. *Pharmacological research*, 130, 143-151.
133. Smeets, E., Kooman, J., van der Sande, F., Stobberingh, E., Frederik, P., Claessens, P., Grave, W., Schot, A., & Leunissen, K. (2003). Prevention of biofilm formation in dialysis water treatment systems. *Kidney International*, 63(4), 1574–1576. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2003.00888.x>
134. Sparwasser, T., Miethke, T., Lipford, G., Erdmann, A., Häcker, H., Heeg, K., & Wagner, H. (1997). Macrophages sense pathogens via DNA motifs: induction of tumor necrosis factor- α -mediated shock. *European Journal of Immunology*, 27(7), 1671–1679. <https://doi.org/10.1002/eji.1830270712>
135. Stach, J. E. M., & Burns, R. G. (2002). Enrichment versus biofilm culture: a functional and phylogenetic comparison of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading microbial communities. *Environmental Microbiology*, 4(3), 169–182. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2002.00283.x>

136. **Stewart, P. S. (2002).** Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. *International Journal of Medical Microbiology*, 292(2), 107–113. <https://doi.org/10.1078/1438-4221-00196>
137. **Suman, E., Varghese, B., Joseph, N., Nisha, K., & Kotian, M. S. (2013).** The bacterial biofilms in dialysis water systems and the effect of the sub inhibitory concentrations of chlorine on them. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*, 7(5), 849.
138. **Sundaram, S., King, A. J., & Pereira, B. J. (1997).** Lipopolysaccharide-binding protein and bactericidal/permeability-increasing factor during hemodialysis: clinical determinants and role of different membranes. *Journal of the American Society of Nephrology*, 8(3), 463–470. <https://doi.org/10.1681/asn.v8i3463>
139. **Thet, N. T., Wallace, L., Wibaux, A., Boote, N., & Jenkins, A. T. A. (2019).** Development of a mixed-species biofilm model and its virulence implications in device related infections. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 107(1), 129-137.
140. **Tielemans, C. (2001).** Are Standards for Dialysate Purity in Hemodialysis Insufficiently Strict? *Seminars in Dialysis*, 14(5), 328–329. <https://doi.org/10.1046/j.1525-139x.2001.0081a.x>
141. **Tremblay, Y. D., Hathroubi, S., & Jacques, M. (2014).** Les biofilms bactériens: leur importance en santé animale et en santé publique. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 78(2), 110-116.
142. **Vanegas Múnera, J. M., & Jiménez Quiceno, J. N. (2019).** Colonization and risk of infection by multidrug-resistant bacteria in hemodialysis patients: a topic of concern. *Infectio*, 23(2), 205-211.
143. **Vinhas, J., & Santos, J. P. D. (2000).** Haemodialyser reuse: facts and fiction. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 15(1), 5-8.
144. **Wang, S., Liu, X., Liu, H., Zhang, L., Guo, Y., Yu, S., Wozniak, D. J., & Ma, L. Z. (2015).** The exopolysaccharide Psl-eDNA interaction enables the formation of a biofilm skeleton in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental Microbiology Reports*, 7(2), 330–340. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12252>

145. **Ward, R. A. (2005).** Dialysis water as a determinant of the adequacy of dialysis. *Seminars in Nephrology*, 25(2), 102–111. <https://doi.org/10.1016/j.semnephrol.2004.09.017>
146. **Wickramasinghe, N. N., Hlaing, M. M., Ravensdale, J. T., Coorey, R., Chandry, P. S., & Dykes, G. A. (2020).** Characterization of the biofilm matrix composition of psychrotrophic, meat spoilage pseudomonads. *Scientific Reports*, 10(1), 1-16.
147. **Wong, J., Vilar, E., & Farrington, K. (2015).** Endotoxemia in end-stage kidney disease. In *Seminars in dialysis* (Vol. 28, No. 1, pp. 59-67).
148. **Wu, D., Fan, W., Kishen, A., Gutmann, J. L., & Fan, B. (2014).** Evaluation of the antibacterial efficacy of silver nanoparticles against *Enterococcus faecalis* biofilm. *Journal of endodontics*, 40(2), 285-290.
149. **Yang, L., Hu, Y., Liu, Y., Zhang, J., Ulstrup, J., & Molin, S. (2011).** Distinct roles of extracellular polymeric substances in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Environmental microbiology*, 13(7), 1705-1717.
150. **Zengler, K., & Palsson, B. O. (2012).** A road map for the development of community systems (CoSy) biology. *Nature Reviews Microbiology*, 10(5), 366–372. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2763>
151. **Zunino, P., Beltrán, L., Zunino, L., Méndez, H., Percovich, V., Rocca, R., & Antonelli, B. (2002).** Microbiological quality of hemodialysis water in a three-year multicenter study in Uruguay. *Journal of Nephrology*, 15(4), 374-379.

Annexes

Annexes

Composition de la gélose R2A en (g/L)

- Protéose peptone : 0,5
- Acides casamino : 0,5
- Extrait de levure : 0,5
- Dextrose : 0,5
- Amidon soluble : 0,5
- Hydrogénophosphate de potassium : 0,3
- Sulfate de magnésium, 7 H₂O : 0,05
- Pyruvate de sodium : 0,3
- Agar : 15

Le tout à un pH final de 7 ± 0.2 à 25 °C.

Composition de la gélose MacConkey en (g/l)

- Peptone pancréatique de gélatine : 17 g
- Peptone pancréatique de caséine : 1,5 g
- Peptone peptique de viande : 1,5 g
- Lactose : 10 g
- Chlorure de sodium : 5 g
- Sels biliaires : 1,5 g
- Rouge neutre : 30 mg
- Violet de gentiane : 1 mg
- Agar : 13,5 g.

Le tout à un pH à $7,1 \pm 0,2$ à 25°C

Composition de la gélose Chapman en (g/l)

- Peptone : 10 g
- Extrait de bœuf : 1 g
- Chlorure de sodium : 75 g
- D-mannitol : 10 g
- Rouge de phénol : 25 mg
- Agar : 15 g.

Ajuster le pH à $7,4 \pm 0,2$ à 25°C

Le tampon PBS (Phosphate Buffered Saline) à 0,1M, pH= 7,2± 2

- KH_2PO_4 0,29 g
- K_2HPO_4 1,19 g
- NaCl 4,93 g

Dans un litre d'eau distillée.

Matrice API 20.01.0.011 pour l'identification des *Bacillus* par la galerie API

Matrice API 20,01.0.011 E pour l'identification des <i>Bacillus</i>		M. Cavalla 31/03/2003																												
Identification	99,6 %	B. sphaericus																												
	% relatif	espèce	Anaérobiose	ONPG	ADH	LDC	ODC	CITRATE	SIMMONS	H2S	URE	TDA	INDOLE	VP	GELATINASE	GLUCOSE	MANNITOL	INOSITOL	SORBITOL	RHAMNOSE	SACCHAROSE	MELIBIOSE	AMYGDALINE	ARABINOSE	OXYDASE	NITRITES	MOBILITE	LECITHINASE	% absolu	
ANAEROBIOSE	0,0	B. alvei	100	80	0	0	0	0	0	75	0	50	99	99	99	1	50	1	1	1	50	50	1	0	25	90	0	0	0	0
ONPG	0,0	B. amyloliquefaciens	0	85	0	0	0	75	0	0	0	0	50	99	99	99	50	99	1	99	50	99	50	0	95	90	0	0	0	1,16E-17
ADH	0,0	B. anthracis	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	99	90	99	1	1	1	1	99	50	1	1	0	99	0	0	90	0	4,69E-15
LDC	0,3	B. brevis	0	25	5	0	0	70	7	3	0	0	57	40	1	1	1	1	1	99	50	1	1	0	50	90	0	0	0	1,16E-05
ODC	0,0	B. carotarum	1	1	1	1	1	50	1	1	1	1	99	50	99	50	50	1	1	50	50	1	50	0	99	50	0	0	0	3,49E-09
CITRATE	0,0	B. cereus	100	0	85	0	1	80	1	50	0	0	60	99	99	1	1	1	1	50	50	1	1	0	99	50	0	0	0	6,91E-14
SIMMONS	0,0	B. cereus (émétique)	100	0	2	0	1	99	14	0	0	0	99	99	99	1	1	1	1	99	50	1	1	0	85	90	90	90	0	5,87E-19
H2S	0,0	B. circulans	50	80	2	0	0	30	4	4	0	4	30	16	99	99	50	1	50	99	50	99	99	0	16	90	0	0	0	3,7E-14
URE	0,0	B. coagulans	100	99	0	0	0	0	0	0	0	0	99	50	99	50	50	50	50	99	50	50	50	0	50	90	0	0	0	1,95E-16
TDA	0,0	B. firmus	0	21	7	0	0	99	0	0	0	0	71	99	99	99	1	1	1	99	50	1	1	0	50	90	0	0	0	5,05E-13
INDOLE	0,0	B. laterosporus (2)	100	0	0	0	0	75	0	0	0	50	50	99	99	99	1	1	1	1	50	50	1	0	75	90	0	0	0	3,7E-14
VP	0,0	B. lentus	0	98	2	0	0	60	1	50	0	0	30	30	99	99	1	50	50	99	50	50	1	0	0	90	0	0	0	1,16E-11
GELATINASE	0,0	B. licheniformis	100	99	93	0	0	77	0	3	0	0	80	99	99	99	50	99	99	99	50	99	99	0	87	90	0	0	0	1,01E-27
GLUCOSE	0,0	B. macerans	100	99	26	0	0	30	0	0	0	0	73	50	99	99	50	50	99	99	50	99	99	0	36	90	0	0	0	5,58E-22
MANNITOL	0,0	B. megatherium (2)	0	83	0	0	5	77	0	0	0	0	88	77	99	99	99	50	1	99	50	99	99	0	77	90	0	0	0	5,82E-18
INOSITOL	0,0	B. mycoides	43	56	6	0	93	0	18	0	0	0	99	99	99	1	1	1	1	50	50	50	1	0	50	1	0	0	0	7,95E-10
SORBITOL	0,0	B. pantothenicus	100	25	0	0	0	20	0	10	0	0	0	50	99	50	50	50	99	99	50	99	1	0	20	90	0	0	0	1,33E-15
RHAMNOSE	0,1	B. pasteurii	0	1	1	1	1	1	1	99	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	50	1	1	0	99	90	0	0	0	4,17E-06
SACCHAROSE	0,0	B. polymyxa	100	99	0	0	0	52	0	0	0	0	99	95	99	99	1	1	50	99	50	99	99	0	71	90	0	0	0	1,7E-22
MELIBIOSE	0,0	B. pumilus	0	99	4	0	0	86	0	0	0	0	99	95	99	99	50	1	1	99	50	99	99	0	25	90	0	0	0	1,23E-18
AMYGDALINE	99,6	B. sphaericus	0	1	0	0	0	60	0	25	0	0	43	37	1	1	1	1	1	1	50	1	1	0	10	90	0	0	0	0,004417
ARABINOSE	0,0	B. stearothermophilus 1	0	50	0	0	0	0	0	0	0	0	12	93	99	50	50	50	1	99	50	1	50	0	50	90	0	0	0	4,7E-09
OXYDASE	0,0	B. stearothermophilus 2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	12	93	99	99	50	99	1	99	50	99	50	0	50	90	0	0	0	3,76E-14
NITRITES	0,0	B. stearothermophilus 3	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	12	93	99	1	1	1	1	99	50	1	1	0	1	90	0	0	0	2,84E-07
MOBILITE	0,0	B. subtilis	0	95	5	0	0	89	0	5	0	0	99	95	99	99	99	99	1	99	50	99	99	0	94	90	0	0	0	7,36E-23
LECITHINASE	0,0	B. thiaminolyticus	100	99	1	1	1	99	99	99	1	99	50	99	99	1	99	1	1	99	50	99	1	0	50	90	0	0	0	1,15E-26
	0,0	B. thuringiensis (1)	100	1	99	0	0	99	0	0	0	0	99	99	99	1	1	1	1	50	50	1	1	0	99	90	0	90	0	2,32E-19
																														0,004433

Bacteriological water quality and biofilm formation in the treatment system of the hemodialysis unit in Tlemcen, Algeria

Touhami Morghad  | Hafida Hassaine | Zakaria Boutarfi | Sarah Gaouar | Samia Bellifa | Zahera Meziani

Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire, au Biomédical et à l'Environnement (LAMAABE), Faculty of Nature and Life, Earth and Universe Sciences, University of Tlemcen, Tlemcen, Algeria

Correspondence

Touhami Morghad, Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire, au Biomédical et à l'Environnement (LAMAABE), Faculty of Nature and Life, Earth and Universe Sciences, University of Tlemcen, Tlemcen, Algeria.
Email: morghadt@yahoo.fr

Abstract

Objective: To evaluate and compare the microbiological quality of osmosis water at the distribution loop, at the dialysis generator inlet and to study the prevalence of biofilm in the tubing.

Methods: Microbiological analysis of 20 water loop samples, 10 water samples were taken at the machine entry and 10 pipe segments from tubing connecting the machines to the loop was done.

Results: The bacterial enumeration results of the loop water vary from 90 to 150 CFU/mL, while the average number of bacteria at the entry of the machines was 182 CFU/mL. The counts of the adhered bacteria in the tubing were worrying with rates ranging from 4.30 to 6.74 Log CFU/ cm². Fifty percentage of the strains isolated were *Bacillus*, followed by *Enterobacter cloacae* 23.52%, Staphylococcus, and others such as *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter baumannii*. More than half of the tubing strains were highly formative of biofilm, 13 strains with medium capacity and 10 were weakly.

Conclusion: This study indicates bacterial water contamination. The formation of a biofilm will certainly harm the effectiveness of the various disinfection methods in this unit. Water quality is influenced not only by the high rate of bacterial colonization, but also differences in standards for dialysis water.

1 | INTRODUCTION

In recent years, the worldwide number of patients involved in hemodialysis has increased, and this technique is the most commonly used modality for the end-stage renal disease.^{1,2}

Patients undergoing dialysis treatment are at a high risk of acquiring systemic infections. Treatment sessions are between 4 and 6 hours where patients are exposed annually and non-selectively to volumes of water varying between 15 000 and 20 000 L of dialysis fluid.³ Therefore, all substances with low molecular weight in water have direct access to the patient's bloodstream. The failure of water treatment systems, including filtration and reverse osmosis, as well as loop and machines disinfection methods, is responsible for the majority of bacteremia, sepsis, and pyrogenic reactions contracted during hemodialysis.⁴⁻⁷

It has been reported that in dialysis water, the greatest incidence is that of Gram-negative bacteria such as *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* and *Burkholderia cepacia*, *Bacillus*, and *Staphylococcus*⁸ in addition to some fungi and protozoa, that can multiply rapidly, even in distilled water. In hemodialysis solutions, this bacterial growth may be faster because of the presence of glucose and bicarbonate, which would lead to high concentrations of endotoxins.^{9,10} Also, treated water and dialysate samples can be a source of infection by bacteria resistant to various antibiotic agents clinically used.¹¹

Bacterial contamination of water in treatment systems and distribution can lead to the formation of biofilms, especially as the treatment station is composed of various types of equipment piping, elbows, loops, muds, and storage tanks, that can be an ideal environment for the biofilms formation. Their presence is worrying because

of bacterial persistence at various points in the system, the continued salting out of bacteria and their components, and the development of greater resistance of sessile bacteria during disinfection procedures,⁷ which can be 3000 times more resistant than their planktonic counterparts.

Biofilms can develop on the inner surface of the tubing in the dialysis fluid pathways. This represents a significant risk to the patients' health. This is due to the sliding of the biofilm, which can cause a large but unpredictable release of bacterial and bacterial endotoxins.^{12,13}

To reduce the infectious risk of these biofilms, they must be prevented on the surface of dialysis systems, like any medical device because no cleaning and/or disinfection process available has the necessary efficiency.

Today, hemodialysis centers control the contamination of dialysis water and a few of them also control dialysate, but the development of biofilm inside tubing and dialysis machines is not taken into consideration. Besides, the replacement of the tubes is not always done.

In this study, the first in Algeria, our objective was to determine and compare the microbiological quality of the water at the distribution loop and the entry of the dialysis generator, by isolating and identifying Gram-negative and Gram-positive bacteria and studying the prevalence of adhered bacteria from tubing sections that connect the generators to the dialysis loop in a hemodialysis unit of Tlemcen university hospital, Algeria.

2 | METHODS

2.1 | Research site

This study was conducted in a hemodialysis unit of Tlemcen University hospital. The service performs approximately 1000

hemodialysis sessions monthly in three groups per day for end-stage renal disease patients. The water treatment system is an integrated unit in the service that includes the pre-treated water tap with a filtration system, a water softener, and an activated carbon filter followed by a final purification with the water reverse osmosis (RO) treatment process. The treated water is distributed directly to the dialysis machines.

After each hemodialysis session, the machines are rinsed and disinfected according to the protocols applied by the service.

2.2 | Water sampling procedure

Under aseptic conditions, water samples (100 mL) were collected from two sites: osmosis water distribution loop and at the dialysis generator entry.

These two sites are chosen to compare the microbiological quality of water in these two points (Figure 1).

2.3 | Counts

The water samples are put in sterile glass bottles and were carried to the laboratory for immediate analysis. According to the recommendations of the European Pharmacopoeia, the water samples were filtered on cellulose acetate membranes (millipore size 0.45 μm), these are then placed on Petri dishes containing Reasoner's 2A agar (R2A, this minimum medium is recommended to limit the bacterial stress caused by the transfer of bacteria from an oligotrophic medium). In parallel, 0.2 mL of each sample is surface-seeded on R2A agar and nutrient agar. The number of CFU was counted after an incubation period of 5 days at 22°C.

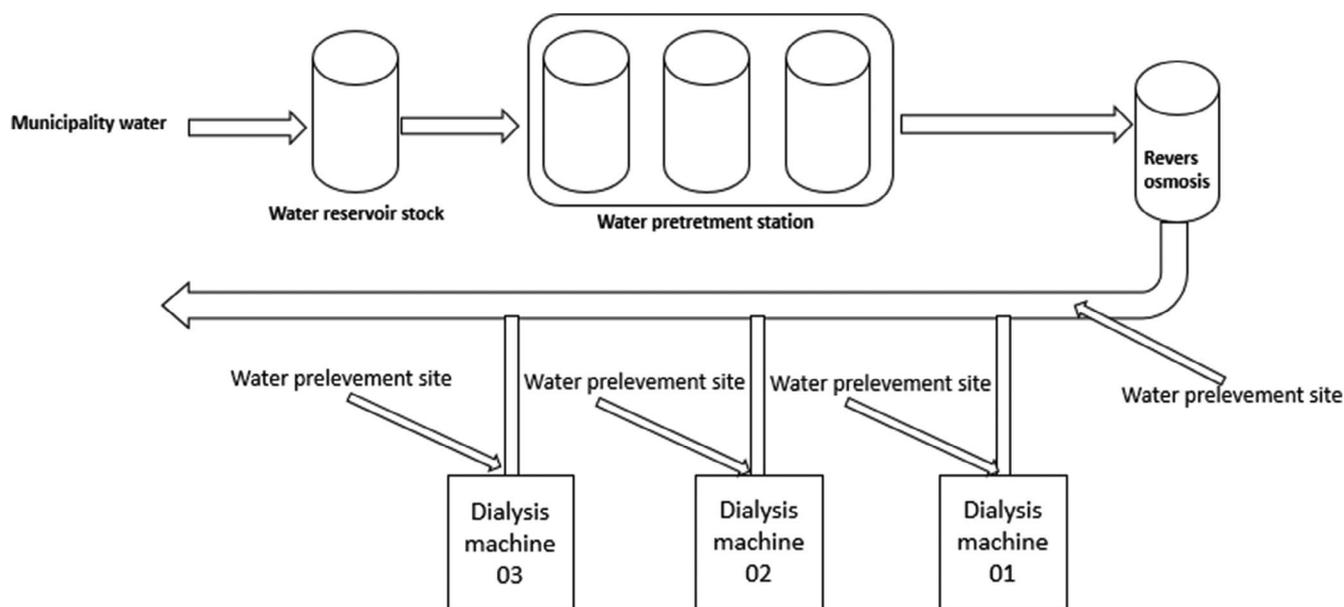


FIGURE 1 Sampling site

2.4 | Identification of isolates

The isolates identification was based on phenotypic characters: Gram, catalase, oxidase, and Api galleries (Bio Mérieux).

2.5 | Treatment of sections of water tubing removed from dialysis machines

Evaluation of the bacteria in biofilm was studied on pre-cut segments of water supply tubing connecting the dialysis generators to the distribution loop, placed in sterile pots and transported aseptically to the laboratory to be analyzed.

The samples were prepared under aseptic conditions, the outer surfaces of the tubings were thoroughly disinfected with alcoholic solution 70%.

The detachment of the bacterial biofilm is carried out according to the technique validated by Smeeth et al., 2003, where they study the detachment of the biofilm in short sections of new and sterile pipes contaminated with known bacterial strains.¹⁴

In our case, it is cut a 1 cm² segment of pipe. A strong swabbing of the internal surface of the segment (pipe) ensures the biofilm detachment. The swabs were immediately put in tubes containing 10 mL of physiological sterile water and then vortexed for 2 minutes to detach the attached bacteria in the swab as much as possible.

After incubation, the colonies were enumerated and the results were expressed in the logarithm of colony-forming units per square centimeter (log CFU/cm²).

Colonies with morphological differences were isolated and purified. The identification of strains was based on Gram staining and biochemical characters (miniaturized identification system API).

All experiments were performed in duplicate and the averages values were calculated.

2.6 | Study of the biofilm formation capacity of isolated strains

The biofilm formation capacity was tested by the crystal violet microtiter plate method. This technique was carried out according to the recommendation of Christensen and collaborator (1985). The different isolated strains were incubated overnight on the BHIB medium at 37°C.

Each young culture is adjusted to 10⁸ CFU/mL and then diluted to 1/100. A volume of 200 µL of this dilution was added to each well. For each strain, three wells were inoculated. The microtiter plate was incubated at a temperature of 37°C for 24 hours.

The wells of the microtiter plates were rinsed three times with sterile distilled water. Then dried and stained with 200 µL of 5% crystal violet for 30 minutes. After the staining step, an abundant wash (five times) was performed with sterile distilled water to remove the

weakly adhered cells. The formed biofilm incorporates the crystal violet and to solubilize and measure this amount of coloring, 200 µL of 95% ethanol was added to each well. The optical density measured was 570 nm.

3 | RESULTS AND DISCUSSION

3.1 | Microbiological quality results

For five months, 20 water samples were taken from the distribution loop (3 to 5 samples per month) and another 10 samples were taken just at the entry of each machine.

The count on the R2A medium promotes the growth of bacteria present in the dialysis water and gives more satisfaction than that made on nutrient agar because the number of bacteria counted was greater 106 CFU/mL against 16 CFU/mL respectively.²⁵ The bacterial enumeration results of the water taken from the distribution loop (Figure 2) varied from 90 to 150 CFU/mL with an average of 118 CFU/mL.

As for the quality of the water at the entry, the various dialysis generators (dialysis machine inlet), this one had a count of bacteria higher than that found in distribution loop water, with an average of 182 ufc/mL; Figure 3). The maximum rates were found at machines M9, M5, and M10 were respectively 220, 202, and 197 CFU/mL.

Since the bacterial count at the entry of the dialysis generators was very important, we wanted to know the contamination and essentially the bacterial adhesion in the water pipes connecting the distribution loop to the different dialysis machines.

The 10 samples of pipe segments corresponding to the 10 dialysis machines show very high contamination by biofilms.

Already the observation with the naked eye of the interior of these segments showed the presence of a thick viscous layer.

The enumeration results of adhered bacteria (biofilm) on 1 cm² are worrying with rates ranging from 4.30 Log CFU/cm² to 6.74 Log CFU/cm² respectively for machines 7 and 9 (Figure 4).

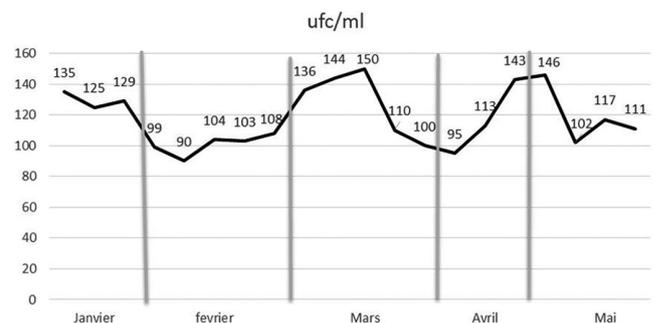


FIGURE 2 Bacterial count of dialysis water taken from the distribution loop for five months

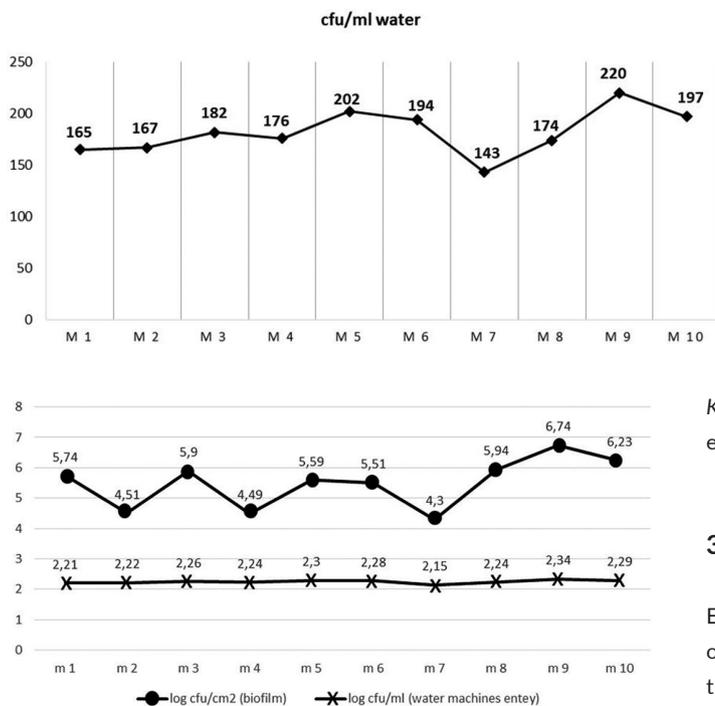


FIGURE 4 Bacterial count of dialysis water at the entry of the generators and the microbial load adhered in the pipes connecting the loop to the generators

3.2 | Bacterial identification results

The most frequent species of bacteria found in the water of the two sites studied (Table 1), were *Bacillus* and represent nearly the half of isolated strains (52%), followed by Enterobacteriaceae including *Enterobacter cloacae* 23, 52% in loop water and 17.39% in the water reaching the generators. Positive and negative Coagulase Staphylococci are also contaminants of dialysis water. Species often considered as markers are also present such as *Klebsiella pneumoniae*, *P aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*.

According to Table 1 and Figure 5, all these species were present in the two types of water analyzed except *A baumannii*, which was found only in the water taken at the entrance of the generators. The distribution of strains isolated in both types of water varied for each species. Some species of the genus *Bacillus* such as *Bacillus mycoides*, *Bacillus lentus*, *Bacillus lechiformis*, and *Bacillus cereus* were found more at the entry of the generators. Also some species of Staphylococcus.

The species *Bacillus pumilis* was present in the loop water more than in the entry of the generators (nearly 9% higher).

The percentage of enterobacteria (*Enterobacter* and *Klebsiella*) decreased and was replaced by an increase of non-fermenting bacteria such as *P aeruginosa* and *A baumannii*.

Of these tubing segments (Table 1), 52 strains were isolated and purified. Among bacterial isolates, the genus *Bacillus* (21) was the most common with predominance of *B mycoides* and *B pumilis*. The *Staphylococci* spp were more regularly distributed. The enterobacteria (11) also found and mainly represented by *E cloacae* (07), 02

FIGURE 3 Bacterial count of dialysis water taken from the generator entry

Klebsiella pneumoniae, 02 *Klebsiella oxytoca*. The other species present in this biofilm were *P aeruginosa* (07) and *A baumannii* (02).

3.3 | Microbial ecology results by dialysis machines

Each sectioned segment of the tubing had a different microbial ecology. The pipes of machines 8 and 9 were highly contaminated and their biofilm was composed of several species, followed by machines 10, 3, and 4 where the species of *B pumilis* was the most representative. *E cloacae*, *B mycoides*, *P aeruginosa*, *A baumannii*, and *S aureus* were also present (Figure 6).

Most species isolated from the biofilm were also present in the water taken at the entry of the dialysis machines. For some species, their presence was mainly in the biofilm namely *Klebsiella oxytoca*. The other species were found in both types of samples (water and biofilm).

Strains isolated from pipe segments showed a difference in biofilm formation capacity. Forty-two of fifty-two strains could form a biofilm, more than half (29) were highly formative, 13 strains with medium capacity and 10 were weakly biofilm-forming. Almost all strains isolated from the tubes of machines 9 and 8 were hyper-biofilm producers, including *P aeruginosa*, *A baumannii*, *E cloacae*, and *S aureus*.

4 | DISCUSSION

Many patients must be treated with renal replacement therapy for a long time because kidney transplantation is not common at Tlemcen University hospital (Algeria). Each week, patients are exposed to approximately 400 to 600 L of water during dialysis, with increased susceptibility to contamination.^{15,16}

High concentrations of bacteria, including fragments of endotoxin, peptidoglycan, and bacterial deoxyribonucleic acid, can cross low and high flux membranes, stimulate cytokine production and set off the elevation of reaction proteins of acute phase such as C-reactive protein.¹⁷

Various microorganisms can multiply rapidly in various fluids that present in the water treatment system in a hemodialysis center, including water produced by distillation, deionization, reverse osmosis

TABLE 1 Isolated strains of loop water, at the entry of the generators and from tubing segments

	Loop water	% of genus	Water entry machines	% of genus	biofilm	% of genus
<i>Bacillus pumilis</i>	(15) 22,09%	51,49%	(6) 13,06%		(7) 13,46%	40,38%
<i>Bacillus mycoides</i>	(11) 16,17%		(8) 17,39%		(6) 11,54%	
<i>Bacillus lentus</i>	(5) 7,35%		(5) 10,86%	49,99%	(4) 7,69%	
<i>Bacillus cereus</i>	(3) 4,41%		(2) 4,34%		(3) 5,77%	
<i>Bacillus lechiniformis</i>	(1) 1,47%		(2) 4,34%		(1) 1,92%	
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	(3) 4,41%	11,76%	(3) 6,55%	15,25%	(3) 5,77%	21,15%
<i>Staphylococcus warneri</i>	(3) 4,41%		(2) 4,36%		(4) 7,69%	
<i>Staphylococcus aureus</i>	(1) 1,47%		(1) 2,17%		(2) 3,85%	
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	(1) 1,47%		(1) 2,17%		(2) 3,85%	
<i>Enterobacter cloacae</i>	(16) 23,52%	23,52%	(8) 17,39%	17,39%	(7) 13,46%	13,23%
<i>Klebseilla pneumoniae</i>	(4) 5,88%	5,88%	(2) 4,34%	4,34%	(2) 3,85%	7,69%
<i>Klebseilla oxytoca</i>	(0) 0,00%		(0) 0,00%		(2) 3,85%	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(5) 7,35%	7,35%	(5) 10,86%	10,86%	(7) 13,46%	13,46%
<i>Acinitobacter baumannii</i>	(0) 0,00%	0%	(1) 2,17%	2,17%	(2) 3,85%	3,85%
Total	(68) 100%	100%	(46) 100%	100%	(52) 100%	100%

and softening. This kind of water is normally considered to be devoid of nutrients.

If the level of bacterial contamination exceeds the currently accepted limits, the result may be sepsis or endotoxemia by Gram-negative bacteria.

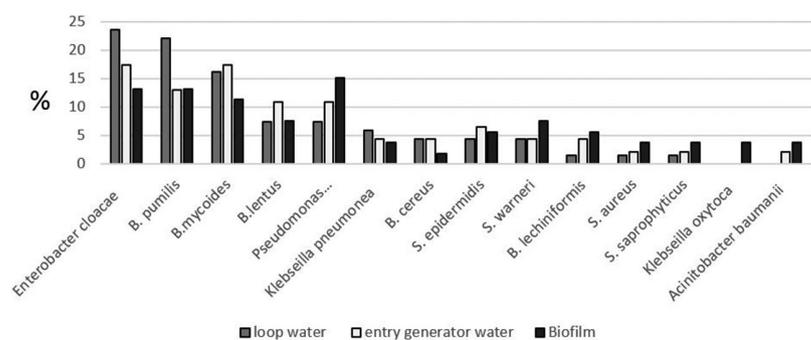
The dialysis water quality upstream of the dialysis machine is essential because it is used in dialysate preparation. This one will interact with the patient's blood through the dialysis membrane and for this reason many standards are proposed to establish the microbiological and chemical quality of the dialysis water; more widely known are the recommendations of the Association for the Advancement of Medical Instrumentation (AAMI 2004)¹⁸ and those of the European Pharmacopoeia (2011).¹⁹

The microbiological recommendations of AAMI allow an upper limit of 200 CFU/mL for microbial contamination and 2 IU/mL for endotoxin contamination of water, the AAMI requires corrective actions of disinfection and cleaning beyond 50 CFU/mL for bacteria and 1 IU/mL for endotoxins. The recommendations of the European Pharmacopoeia set more restrictive limits: bacterial contamination <100 CFU/mL and endotoxins <0.25 IU/mL.²⁰

Our counts (118 CFU/mL at the loop and 182 CFU/mL at the entry of the dialysis machines) show that the water used for dialysate preparation is contaminated, and exceeds the standards of the European Pharmacopoeia and that of the Ministry of Health in Algeria requiring a level of contamination below 100 CFU/mL. The microbiological quality of the water analyzed was well below the limits recommended by the IMAA.

Currently, concerning microbiological limits and cultivation techniques, in addition to the international standard AAMI²¹ and the European Pharmacopoeia, an equivalent international standard²² is currently under revision, proposes to reduce the two levels of bacteria and endotoxin levels in this new standard, published in 2009. These recommendations focus on culture techniques, particularly for bacteria: Tryptone Glucose Extract Agar (TGEA) and Reasoner Agar (R2A) at 17-23°C for 7 days. A recommended practice providing guidelines for the use, care, and/or treatment of a medical device or medical system is necessarily should not be a static document applied to a dynamic technology.

Counting bacteria on both R2A media and nutrient agar shows and proves that the enumeration of microorganisms that develop in

**FIGURE 5** Percentages of strains isolated from loop water, biofilm and water entering the dialysis generators

	<i>B. cereus</i>	<i>B. licheniformis</i>	<i>B. pumilis</i>	<i>B. lentus</i>	<i>B. myoides</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. saprophyticus</i>	<i>S. warneri</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. oxytoca</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>A. baumannii</i>	Total
m 1				X O	X O					X			O		3 / 3
m 2	X	X O	O		X				O	O			X		4 / 4
m 3		O	X O		X		X O			X O			X O		6 / 5
m 4			X O		X O		X O			X			X O		5 / 4
m 5			X	X O						X O	X O		X O		5 / 4
m 6		X	O	X	X O			O		O		O			3 / 5
m 7			X O		X O		X O			X					4 / 3
m 8	X O	O	X O			O		X O	X O	X O	O	O	X O		6 / 9
m 9			O	X O	X O	X O				X O	X O		O	X O	6 / 8
m 10			X	X O	X O		O			O	X O		O	O	4 / 7
Total	1/2	2 / 3	6 / 7	5 / 4	8 / 6	1 / 2	3 / 3	1 / 2	2 / 4	8 / 7	2 / 2	0 / 2	5 / 7	1 / 2	46 / 52

FIGURE 6 Breakdown of identified strains in biofilm by machine. **X**: strains water entry machine; **O**: tubulure strains

extreme environments shows better laboratory culture results when they are incubated under conditions that simulate these environments. For this reason, the bacteria present in the dialysis water is better cultivated on nutrient-poor media, such as R2A and incubated for more than 96 hours and temperatures around 22°C.^{8,20,23-26} In our case, the number of bacteria grown on R2A agar is 3 to 11 times higher than that of nutrient agar.

The comparison of our bacterial concentration results for the water samples, over a 5-month monitoring period with water arriving at the 10 dialysis machines included in this study, is shown in Figures 1 and 2. All water counts at the entry of the generators are more contaminated (182 CFU/mL on average) than that of the loop water (118 CFU/mL on average) with quantities greater than those allowed by the national standards of 100 CFU/mL. Twenty samples were analyzed and 17 exceeded 100 CFU/mL and all the samples taken at the entry of the machines exceeded the standards recommended by the European Pharmacopoeia.

The number of heterotrophic bacteria allowed by national standards in water is worrying because it is part of dialysate that promotes the growth of microorganisms which can release large amounts of endotoxin.

Similar studies give different results, and this is due to the microbial ecology of the centers studied and also due to differences in study methods.^{17,27}

In this dialysis center, disinfection of the water treatment system is not done regularly, no procedure is documented.

According to service staff, the water purification systems of the service did not have a maintenance protocol for the water purification systems. These results show that water system managers are still unaware of the importance of regular maintenance and internal quality control of the water purification system.²⁷ Sometimes the supply of the disinfectant is not assured regularly, and every time there was a change of the disinfectant.

In most hemodialysis centers, staffs believe that the dialyzer filter provides total protection to patients, and does not allow any dangerous molecules to pass through patients' blood.

Water arriving at dialysis machines is significantly more contaminated than that of the loop, this can be explained by the growth of bacteria in biofilm, macroscopically visible in the form of a white coating on the inner walls of plastic pipes providing the connection between the loop and the dialysis machines. This state was confirmed by enumeration of adhered bacteria, where the level of contamination by machine could be 5.5×10^6 CFU/cm² or 25 000 times that of generator water 220 CFU/mL.

The pipes that connect the generators and the dialysis loop have the particular feature that was never being changed and disinfected,

neither during the disinfection of the dialysis loop nor during the disinfection of the machine after each session.

The number of adhered bacteria varies from 4.3 to 6.74 log CFU/cm²; these tubules are nearly 2 m long and the number of bacteria adhered is at the order of billions. This high level of contamination is a health hazard for dialysis patients.

Thus, the water in these pipes is stagnated when the machines are stopped posing a real problem in the system of dialysis water treatment. The introduction of a new process for the regular and efficient disinfection of this area is therefore essential for the hygienic maintenance of the water treatment units to maintain the bacterial count values below the action level and therefore a better hemodialysis quality.²⁸

All surfaces in the hemodialysis fluid pathways are susceptible to biofilm invasion.^{14,29-31} The importance and speed of biofilm growth will depend on three main factors: types of materials; the design of the distribution system, including flow rates and dead zones; and the frequency and effectiveness of disinfection treatments.²⁹

Very few studies are aimed at biofilms in hemodialysis systems. However, studies have been conducted and agree that biofilms are a major problem for which routine disinfection treatments are ineffective.³²⁻³⁴

This suggests that despite the routine disinfection procedure, biofilms develop in the hydraulic circuit of the water treatment system and/or hemodialysis monitors. Nystrand was reported that a microbial count result in a system, that is regularly disinfected because of somewhere in the system, microbial growth is current, has been shown that the presence of a biofilm on the pipes led to rapid regrowth of the bacteria after a few hours of disinfection of the water supply system.^{17,35}

The arrival water to dialysis machines is very contaminated by bacteria where they will find a place with adequate pH, a temperature of 37°C and glucose. With all these factors and an average period of 3 hours for each dialysis session, the bacteria multiply rapidly and considerably.

Each dialysis system of water production has a particular microbial ecology, considering the difference in the source of water, the general state of hygiene of the reservoirs, the treatments undergone, the degree and frequency of disinfection.³⁶

The identification of bacteria present in the dialysis water (loop and generators) shows the major presence of bacteria commonly found in water such as *Bacillus* and coliforms including *E. cloacae*.⁸ The bacterial species found in our study are also identified in other similar studies. What seems worrying is not only the presence of marker and pathogenic bacteria such as *P. aeruginosa*, *A. baumannii*,

and *S aureus* in the water of the generators and consequently the dialysate, which can cause serious infections at dialyzed patients by releasing of toxins, but also their ability to live in biofilm because almost all are biofilm-forming and resistant to all disinfectants,⁸ and are source of endotoxins which present a real threat in the dialysis process.^{8,37,38}

Several Gram-negative bacilli have been isolated from the water distribution system and dialysate. We isolated *Pseudomonas* genus at 52.8% in agreement with other authors.¹⁷

5 | CONCLUSION

The water quality in dialysis units is influenced by the colonization rate and the presence of biofilm in the distribution system. Therefore, the use of disinfection methods, recommended by the standards, prevents the occurrence of infections and endotoxin shock of hemodialysis patients.

Differences in standards in terms of microbiological quality of dialysis water remain a dubious point that favors a lot of deviation. Microbiological standards must be strict and uniform.

Also a germ-free and endotoxin-free dialysate does not exclude the risks. The risks of bacterial and endotoxin discharge from the biofilm developed on the circuit tubing, acting as a reservoir for continuous contamination.

We believe that cleaning, disinfection optimization efforts, and the procedures used for hemodialysis systems should aim to detach and neutralize the biofilm when necessary.

ORCID

Touhami Morghad  <https://orcid.org/0000-0001-6608-695X>

REFERENCES

- Dadgari A, Dadvar L, Eslam-Panah H. Multidimensional fatigue syndrome and dialysis adequacy among elderly patients under hemodialysis treatment. *IJHS*. 2015;1:5-8.
- Ebrahimi H, Sadeghi M, Amanpour F, Dadgari A. Influence of nutritional education on hemodialysis patients' knowledge and quality of life. *Saudi J Kidney Dis Transpl*. 2016;27:250-255.
- Locatelli F, Altieri P, Andrulli S, et al. Hemofiltration and hemodiafiltration reduce intra dialytic hypotension in ESRD. *J Am Soc Nephrol*. 2010;21:1798-1807.
- Schiavano GF, Parlani L, Sisti M, Sebastianelli G, Brandi G. Occurrence of fungi in dialysis water and dialysate from eight hemodialysis units in central Italy. *J Hospital Infect*. 2014;86:194-200.
- Ducki S, Francini N, Blech MF. Circuit de traitement d'eau pour hémodialyse : mais où se cache le Bacille pyocyanique ? *Néphrologie Thérapeutique*. 2005;1:126-130.
- Jackson BM, Beck-Sague CM, Bland LA, Arduino MJ, Meyer L, Jarvis WR. Outbreak of pyrogenic reactions and Gram-negative bacteremia in a haemodialysis center. *Am J Nephrol*. 1994;14:85-89.
- Smeets ED, Kooman J, van der Sande F, et al. Prevention of biofilm formation in dialysis water treatment systems. *Kidney Int*. 2003;63:1574-1576.
- Gomila M, Gascó J, Busquets A, et al. Identification of culturable-bacteria present in haemodialysis water and fluid. *FEMS Microbiol Ecology*. 2005;52:101-114.
- Pisani B, Simões M, Prandi MAG, et al. Outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia in a Hemodialysis Center in Campinas, São Paulo, Brazil. *Revista Instituto Adolfo Lutz*. 2000;59:51-56.
- Santos F, Santos AG, Biernat JC, et al. Endotoxin detection by Limulus Amebocyte Lysate (LAL) test in hemodialysis units. 2000. *Medicina on line - Revista Virtual de Med*. 1.
- Berns JS, Tokars JJ. Preventing bacterial infections and antimicrobial resistance in dialysis patients. *Am J Kidney Dis*. 2000;40:886-898.
- Favero MS, Carson LA, Bond WW, Petersen NJ. Factors that influence microbial contamination of fluids associated with hemodialysis machines. *Appl Microbiol*. 1974;28(5):822-830.
- Coulliette AD, Arduino MJ. Hemodialysis and water quality. *Semin Dial*. 2013;26:427-438.
- Suman E, Varghese B, Joseph N, Nisha K, Kotian MS. The bacterial biofilms in dialysis water systems and the effect of the sub inhibitory concentrations of chlorine on them. *J Clin Diagn Res*. 2013;7(5):849-852.
- Zhang J, Burr RA, Sheth HS, Piraino B. Organism-specific bacteremia by hemodialysis access. *Clin Nephrol*. 2016;86:141-146.
- Hoenich NA, Levin R. The implications of water quality in hemodialysis. *Semin Dial*. 2003;16:492-497.
- Oumokhtar B, Ouali AE, Mahmoud M, Berrada S, Arrayhani M, Houssaini TS. Prevent infection linked to the dialysis water in a hemodialysis center in Fez city (Morocco). *Pan Afr Med J*. 2013;116:122.
- European Pharmacopoeia. 8th Edition. Concentrated solutions for hemodialysis. 2014. 6.
- Association for the Advancement of Medical Instrumentation. *Guidance for the Preparation and Quality Management of Fluids for Hemodialysis and Related Therapies*. ANSI/AAMI/ISO 23500. 2011. Arlington, VA: Author, 2011.
- Pontoriero G, Pozzoni P, Andrulli S, Locatelli F. The quality of dialysis water. *Nephrol Dial Transplant*. 2003; 18(suppl 7), vii21-vii25.
- AAMI RD62. Water treatment equipment for hemodialysis applications association for the advancement of medical instrumentation; 2006.
- ISO 13959:2014. Eau pour hémodialyse et thérapies apparentées.
- Allen MJ, Edberg SC, Reasoner DJ. Heterotrophic plate count bacteria - what is their significance in drinking water? *Int J Food Microbiol*. 2004;92:265-274.
- Carter JT, Rice EW, Buchberger SG, Lee Y. Relationships between levels of heterotrophic bacteria and water quality parameters in a drinking water distribution system. *Wat Res*. 2000;34(5):1495-1502.
- Reasoner DJ. Heterotrophic plate count methodology in the United States. *Int J Food Microbiol*. 2004;92:307-315.
- Van der Linde K, Lim BT, Rondeel JM, Antonissen LPMT, De Jong GMT. Improved bacteriological surveillance of haemodialysis fluids: a comparison between Tryptic soy agar and Reasoner's 2A media. *Nephrol Dial Transplant*. 1999;14:2433-2437.
- Abualhasan M, Basim A, Salahat A, Sofan S, Al-Atrash M. Quality of water used in Palestinian hemodialysis centers. *Public Health*. 2018;165:136-141.
- Bolasco P, Contu A, Meloni P, Vacca D, Galfrè A. Microbiological surveillance and state of the art technological strategies for the prevention of dialysis water pollution. *Int J Environ Res Public Health*. 2012;9(8):2758-2771.
- Phillips G, Hudson S, Stewart WK. Persistence of microflora in biofilm within fluid pathways of contemporary hemodialysis monitors (Gambro AK-10). *J Hosp Infect*. 1994;27(2):117-125.
- Man N-K, Degremont A, Darbord J-C, et al. Evidence of bacterial biofilm in tubing from hydraulic pathway of hemodialysis system. *Artif Organs*. 1998;22(7):596-600.
- Capelli G, Ballestri M, Perrone S, et al. Biofilms invade nephrology. *Blood Purif*. 2003;18:224-230.

32. Marion-Ferey K, Pasmore M, Stoodley P, et al. Biofilm removal from silicone tubing: an assessment of the efficacy of dialysis machine decontamination procedures using an in vitro model. *J Hosp Infect.* 2003;53:64-71.
33. Holmes CJ, Degremont A, Kubey W, et al. Effectiveness of various chemical disinfectants versus cleaning combined with heat disinfection on *Pseudomonas* biofilm in hemodialysis machines. *Blood Purif.* 2004;22:461-468.
34. Isakozawa Y, Migita H, Takesawa S. Efficacy of biofilm removal from hemodialysis piping. *Nephro-Urol Mon.* 2016;8(5):e39332.
35. Nystrand R. Microbiology of water and fluids for haemodialysis, review article. *J Chin Med Assoc.* 2008;71:223-229.
36. Montanari LB, Sartori FG, Cardoso MJdO, et al. Microbiological contamination of a hemodialysis center water distribution system. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2009;51:37-43.
37. Roth VR, Jarvis WR. Outbreaks of infection and/or pyrogenic reactions in dialysis patients. *Semin Dial.* 2000;13:92-96.
38. James R. Monitoring of dialysis water systems – is there a need for increased sampling. *EDTNA ERCA J.* 2006;32(2):74-77.

How to cite this article: Morghad T, Hassaine H, Boutarfi Z, Gaouar S, Bellifa S, Meziani Z. Bacteriological water quality and biofilm formation in the treatment system of the hemodialysis unit Tlemcen, Algeria. *Semin Dial.* 2020;00:1–8. <https://doi.org/10.1111/sdi.12898>

المخلص

تتناول هذه الدراسة جودة المياه الميكروبيولوجية لمياه الغسيل الكلوي في مستشفى تلمسان. تم أخذ عينات من المياه لمدة 5 أشهر لتقييم جودة المياه الميكروبيولوجية لمياه الغسيل الكلوي. تشير النتائج إلى أن جودة المياه في حلقة التوزيع غير مقبولة، بمتوسط عدد بكتيريا يصل إلى 118 CFU / mL ، نلاحظ أن المياه عند مدخل آلات الغسيل الكلوي تحتوي على تركيزات بكتيرية أعلى من المستويات الموصى بها (100 UFC/mL) أي بمتوسط 182 mL / UFC. يجب اتخاذ إجراءات تصحيحية للتطهير والتنظيف لتحسين جودة مياه الغسيل الكلوي وتقليل مخاطر التلوث البكتيري للمرضى. تكون المياه عند مدخل الآلات هي الأكثر تلوثاً بسبب نمو البكتيريا في الفيليم الحيوي الموجود في أنابيب البي في سي المرتبطة بالآلات. تكون مستويات التلوث في هذه الأنابيب عالية جداً، بعدد بكتيريا مرتبط يصل إلى 10^6 UFC/cm² ، وهو يمثل خطراً على صحة المرضى الذين يتلقون الغسيل الكلوي. الأنواع البكتيرية الأكثر شيوعاً هي *Bacillus* ، *Enterobacter cloacae* ، *Staphylococcus* ، *Klebsiella pneumoniae* ، *Pseudomonas aeruginosa* ، *Acinetobacter baumannii*. يعدّ الغشاء الحيوي مشكلة كبيرة في أنظمة الغسيل الكلوي، لكن هناك قليل جداً من الدراسات التي تهتم بهذا الموضوع. تكون سطوح مسارات السوائل الكلوية عرضة للغزو البكتيري. يُعد معظم السلالات المعزولة من الأنابيب هي نفسها التي تم عزلها من مياه الغسيل الكلوي، ولديها صفة الإنتاج الزائد للفيليم الحيوي. تؤكد صور المجهر الإلكتروني المسحي هذه القدرة على تكوين الفيليم الحيوي. تحتاج 34% من السلالات المعزولة من أنابيب المرتبطة بالجهاز إلى تركيز أعلى من تركيز المطهر المستخدم والموصى به من قبل المورد. لا يتضمن تكوين الأغشية الحيوية على دعائم لا حيوية نوعاً واحداً من البكتيريا ولكنها في الكثير من الأحيان مختلطة تشمل عدة أنواع من البكتيريا. بعد تجاربنا المخبرية لإعادة إنتاج الأفلام المختلطة (نوعان)، نستنتج أنها ظاهرة معقدة جداً. وفقاً لتركيبات الأنواع المختلفة من البكتيريا، تتفاعل هذه الأنواع إما بتأثيرات تعاونية أو عدائية. تكون نمو بعض الأنواع في الأغشية المختلطة أعلى من نموها في أغشية أحادية النوع. تُظهر التفاعلات بين *Pseudomonas aeruginosa* و *Staphylococcus epidermidis* منافسة على العناصر الغذائية، مما يؤدي إلى بطء نمو *S. epidermidis*. بالمقابل، يتعايش *Staphylococcus aureus* في النهاية، من الضروري الحفاظ على بروتوكولات التعقيم والتنظيف المناسبة لمعدات الغسيل الكلوي ومراقبة جودة المياه وكذلك وجود الأغشية الحيوية بانتظام.

كلمات مفتاحية: مياه الغسيل الكلوي، الجودة الحيوية، حلقة التوزيع، الات الغسيل الكلوي، CMI المطهرات، الأغشية الحيوية، الأغشية الحيوية المختلطة، مستشفى تلمسان.

Résumé

Cette étude porte sur la qualité microbiologique de l'eau de dialyse au CHU Tlemcen. Des prélèvements d'eau pendant 5 mois ont été effectués afin d'évaluer la qualité microbiologique de l'eau de dialyse. Les résultats montrent que la qualité de l'eau à la boucle de distribution n'est pas acceptable avec un dénombrement bactérien moyen de 118 UFC/mL, l'eau à l'entrée des machines de dialyse présente des dénombrements plus élevés, dépassant les limites recommandées (100 UFC/mL) avec un moyen de 182 UFC/mL. Les actions correctives de désinfection et nettoyage pour améliorer la qualité de l'eau de dialyse et réduire les risques de contamination bactérienne pour les patients sont indispensables. L'eau à l'entrée des machines est plus contaminée en raison de la croissance de bactéries dans le biofilm présent dans les tuyaux en PVC reliant machines de dialyse à la boucle. Le niveau de contamination dans ces tuyaux est très élevé, avec un dénombrement de bactéries adhérentes allant jusqu'à 10^6 UFC/cm², ce qui représente un danger pour la santé des patients dialysés. Les bactéries les plus fréquemment retrouvées sont le *Bacillus*, *Enterobacter cloacae*, les staphylocoques, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii*. Le biofilm est un problème majeur dans les systèmes d'hémodialyse, mais très peu d'études s'intéressent à ce sujet. Les surfaces des voies de liquide de dialyse sont toutes susceptibles à l'invasion de biofilm. La plupart des souches isolées des tubulures des machines sont les mêmes de celles isolées de l'eau de dialyse et elles ont la tendance d'être hyper-productrices de biofilm. L'imagerie par microscopie électronique à balayage confirme cette capacité de formation de biofilm. 34% des souches isolées des tubulures nécessitent une concentration supérieure à la CMI de désinfectant utilisé et recommandée par le fournisseur. La formation de biofilms sur support abiotique n'implique jamais une seule espèce bactérienne mais très souvent elle est mixte impliquant plusieurs espèces de bactéries. Suite à nos essais *in vitro* de reproduire biofilms mixtes (deux espèces), nous concluons que c'est un phénomène très complexe. Selon la combinaison des différentes espèces de bactéries, celles-ci interagissent soit avec des effets synergétiques ou antagonistes. La croissance de certaines espèces en biofilms mixtes est supérieure à leur croissance en biofilms mono espèce. L'interaction entre *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus epidermidis* montre une compétition pour les nutriments, qui conduit à une croissance plus lente de *S. epidermidis*. En revanche, *S. aureus* cohabite avec *P. aeruginosa* avec des charges bactériennes plus élevées. Enfin, il est primordial de maintenir des protocoles de désinfection et de nettoyage appropriés pour les équipements de dialyse et de surveiller régulièrement la qualité de l'eau et la présence de biofilms.

Mots clés : eau de dialyse, qualité microbiologique, boucle de distribution, machines de dialyse, CMI de désinfectant, biofilm, biofilm mixte, CHU Tlemcen

Summary

This study focuses on the microbiological quality of dialysis water at CHU Tlemcen. Water samples were collected for 5 months to evaluate the microbiological quality of dialysis water. The results show that the quality of water in the distribution loop is not acceptable, with an average bacterial count of 118 CFU/mL, while the water at the entrance of dialysis machines has higher counts exceeding recommended limits (100 CFU/mL) with an average of 182 CFU/mL. Corrective disinfection and cleaning actions to improve dialysis water quality and reduce bacterial contamination risks for patients are essential. Water at the entrance of machines is more contaminated due to bacterial growth in the biofilm present in PVC pipes connecting the dialysis machines to the loop. The contamination level in these pipes is very high, with a count of adhered bacteria up to 10^6 CFU/cm², representing a hazard to the health of dialysis patients. The most frequently bacteria founded are *Bacillus*, *Enterobacter cloacae*, *Staphylococci*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter baumannii*. Biofilm is a major problem in hemodialysis systems, but very few studies address this issue. The surfaces of the dialysis fluid pathways are all susceptible to biofilm invasion. Most strains isolated from machine tubing are the same as those isolated from dialysis water and tend to be hyper-biofilm producers. Scanning electron microscopy confirms this biofilm formation capacity. 34% of strains isolated from tubing require a higher disinfectant concentration than that recommended by the supplier. Biofilm formation on abiotic support never involves a single bacterial species, but it is often mixed involving several bacterial species. Following *in vitro* experiments to reproduce mixed biofilms (two species), we conclude that this is a very complex phenomenon. Depending on the combination of different bacterial species, they interact either with synergistic or antagonistic effects. The growth of some species in mixed biofilms is superior to their growth in mono-species biofilms. The interaction between *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus epidermidis* shows competition for nutrients, leading to slower growth of *S. epidermidis*. On the other hand, *S. aureus* coexists with *P. aeruginosa* with higher bacterial loads. In conclusion, it is essential to maintain appropriate disinfection and cleaning protocols for dialysis equipment and to regularly monitor water quality and the presence of biofilms.

Keywords: dialysis water, microbiological quality, distribution loop, dialysis machines, disinfectant MIC, biofilm, mixed biofilm, CHU Tlemcen.