



Diagnostic rapide des micro-organismes par ATP-métrie

Centre Hospitalier François Dunan
Archipel de Saint Pierre et Miquelon

Claire Letournel
Pharmacien
CH François Dunan
SPM

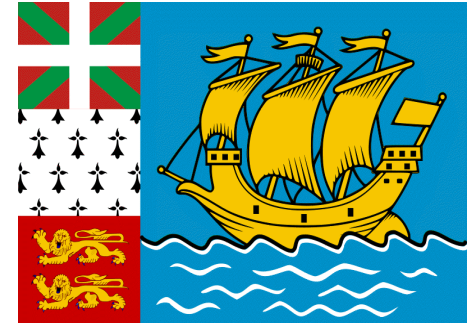
François Babinet
Néphrologie-Dialyse
ECHO-Pôle Santé Sud
Le Mans
Conflit d'intérêt : néant

Remerciements

- Véliana TODOROVA
 - Baxter – Gambro
- Bénédicte ALLARD – Rachida BEGRI
 - PUI – ECHO
- Céline HAMON
 - IDE PSS



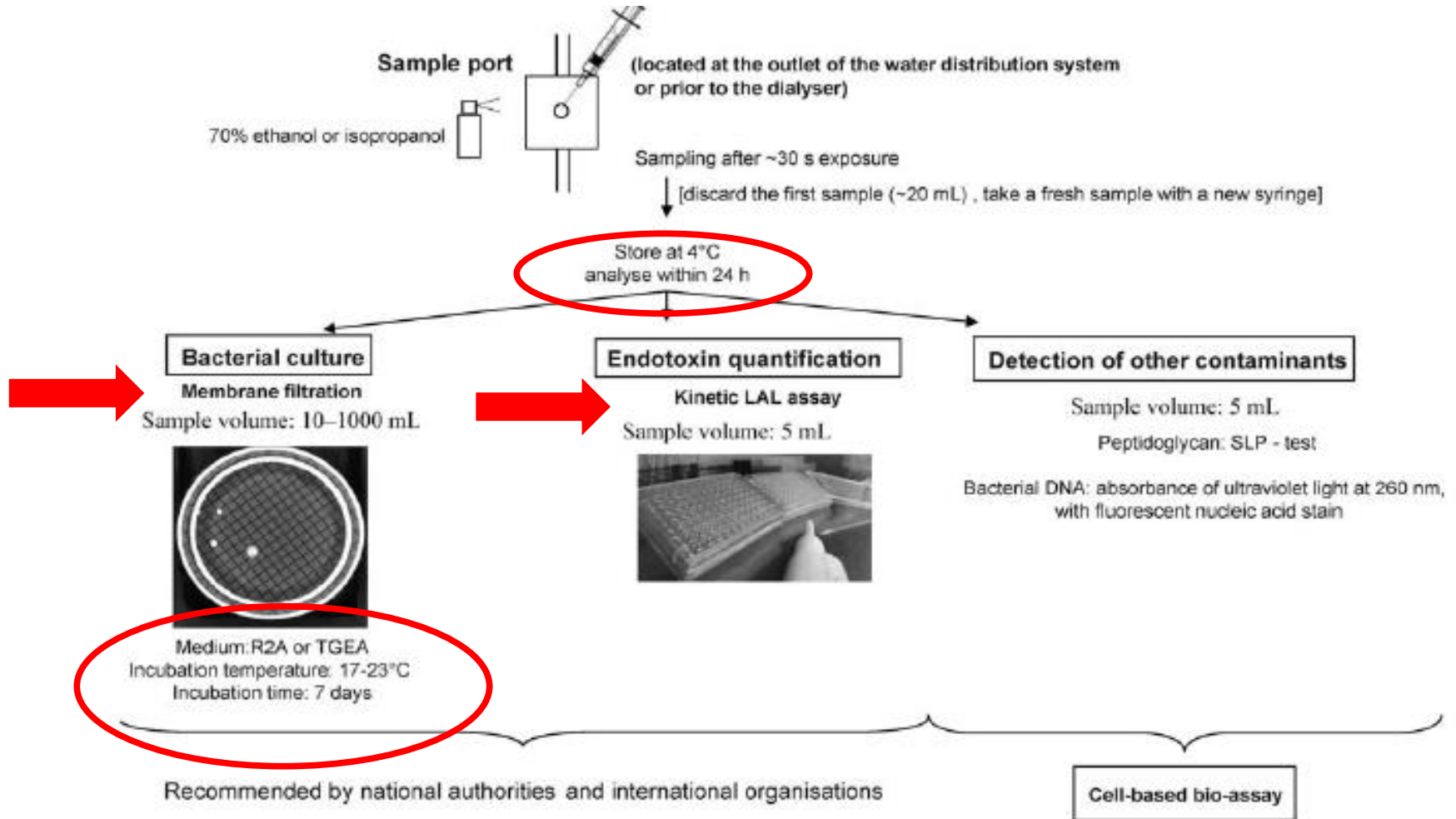
Pourquoi SPM ?



- CS de néphrologie sur l'Archipel de SPM
 - Pr. H. Nivet depuis 10 ans
 - Relais FB à partir de 2011
- Dialyse sur l'Archipel
 - 1 patiente en HDD de 1976 à 1983 (formation à Montréal)
 - DP début 2000
 - HDC en télé-médecine St Brieuc mars 2011
 - Relais ECHO sept 2012 – installation UDM nouveau CHFD
 - Station PERMO – 5 générateurs Fresenius 5008 H
 - Nov 2016 : 3 patients (2 en attente)
 - Responsabilité « partagée » sur le traitement d'eau



Eau pour HD



Eau pour HD : analyses réglementaires à SPM

- Prélèvements **jeudi** pour être chez le transitaire avant 16h30
- **Vol Air St Pierre samedi (3h)** : cale non réfrigérée
- Transit Montréal contrôle sécurité Canada
- Vol AF cale réfrigérée (7h) : CDG dimanche matin → chambre froide (transit fret)
- Transporteur lundi journée camion réfrigéré
- Livraison Bioclin **lundi soir** ou mardi matin
- 4 jours min incompressibles – coût 600 €

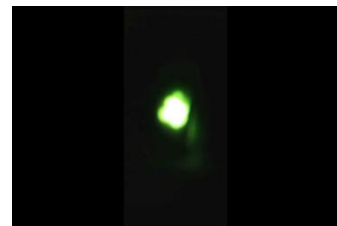
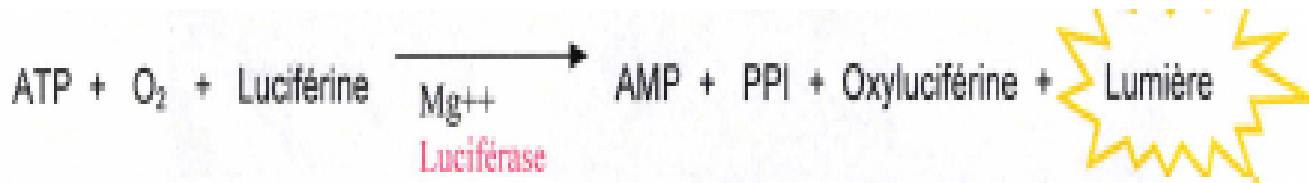


Qu'est-ce que l'ATP-métrie?

- **L'ATP** est la molécule de **stockage d'énergie** présente dans tous les organismes vivants.
- **Mesure simple et rapide** du taux d'ATP (Adénosine TriPhosphate) intracellulaire pour quantifier de façon non spécifique **tous les microorganismes** présents dans les échantillons d'eau.
- Principe de bioluminescence : réaction enzymatique traduisant une quantité d'ATP en **quantité de lumière**.

La Bioluminescence de la Luciole : le principe

- Cette technique utilise une enzyme, la **luciférase**.
- Elle a pour substrat la **luciférine** qui, avec de l'ATP, produit de la lumière quantifiable grâce à un bioluminomètre. Une relation permet de connaître la concentration en ATP en fonction de la lumière.



Mesure de l'ATP

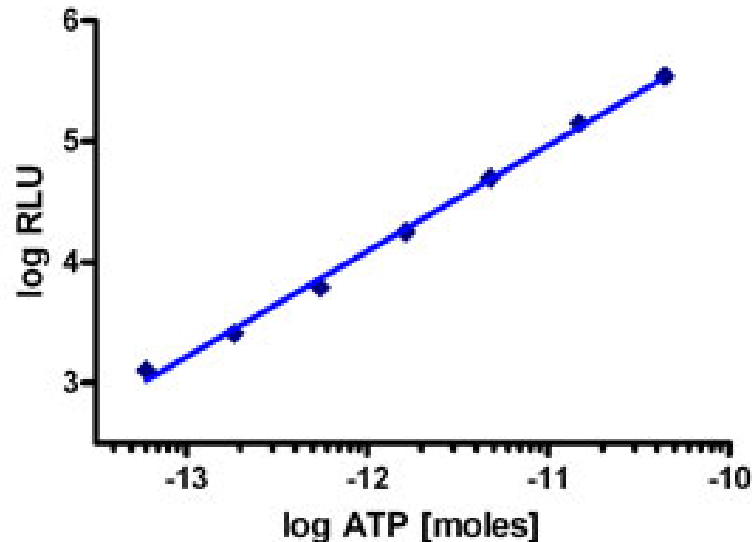
Relation proportionnelle entre la lumière produite et la population de micro-organismes

Relation proportionnelle entre luminescence émise et mesurée et la concentration en ATP : 1 ATP → 1 photon

Limite de détection de cette technique est très faible :

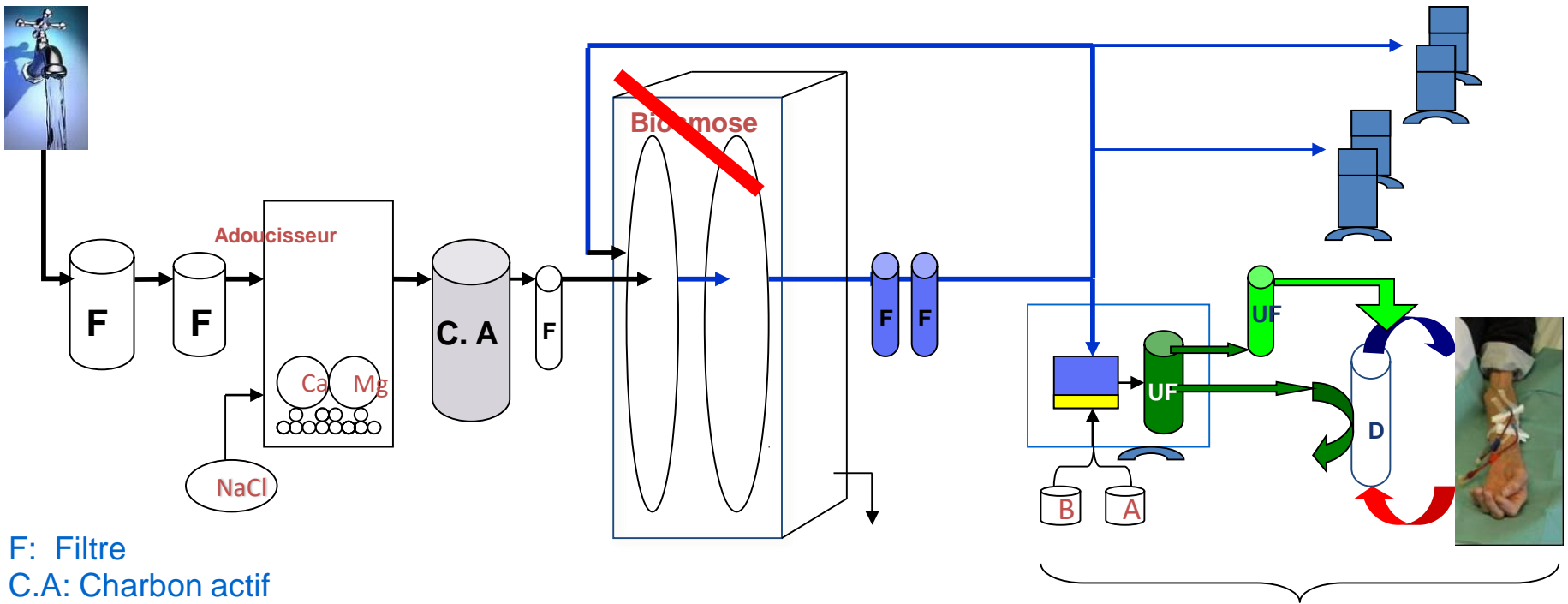
0.1 pg ATP = 100 μorganismes (MO).

RLU = relative light unit





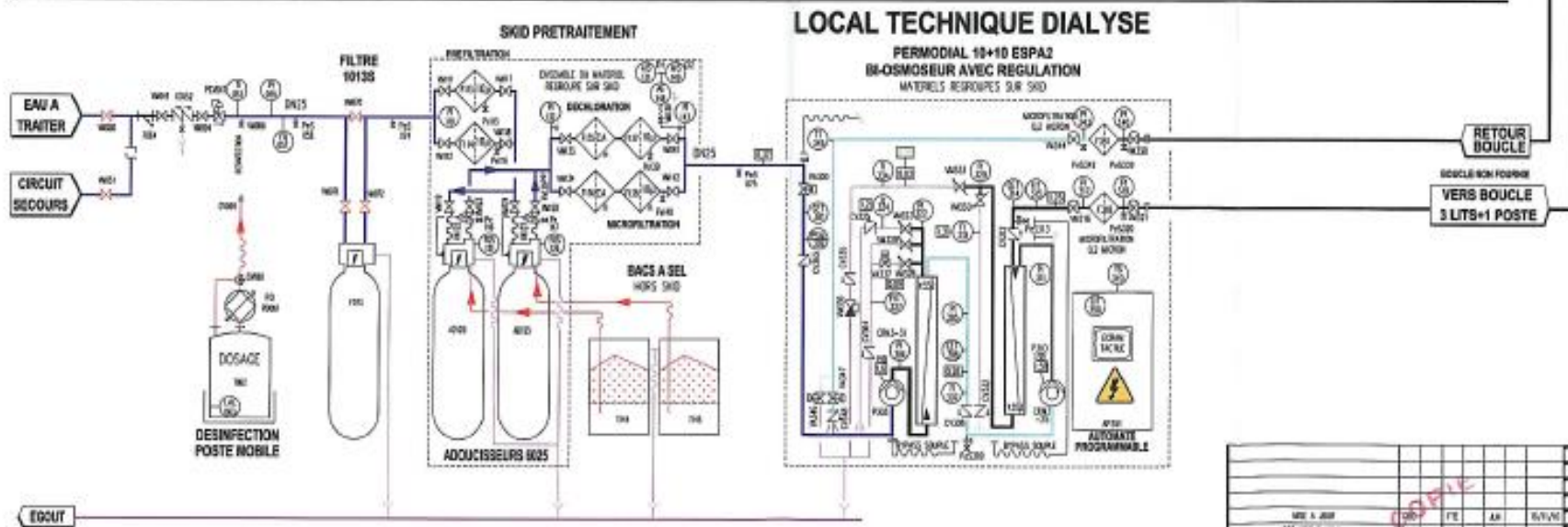
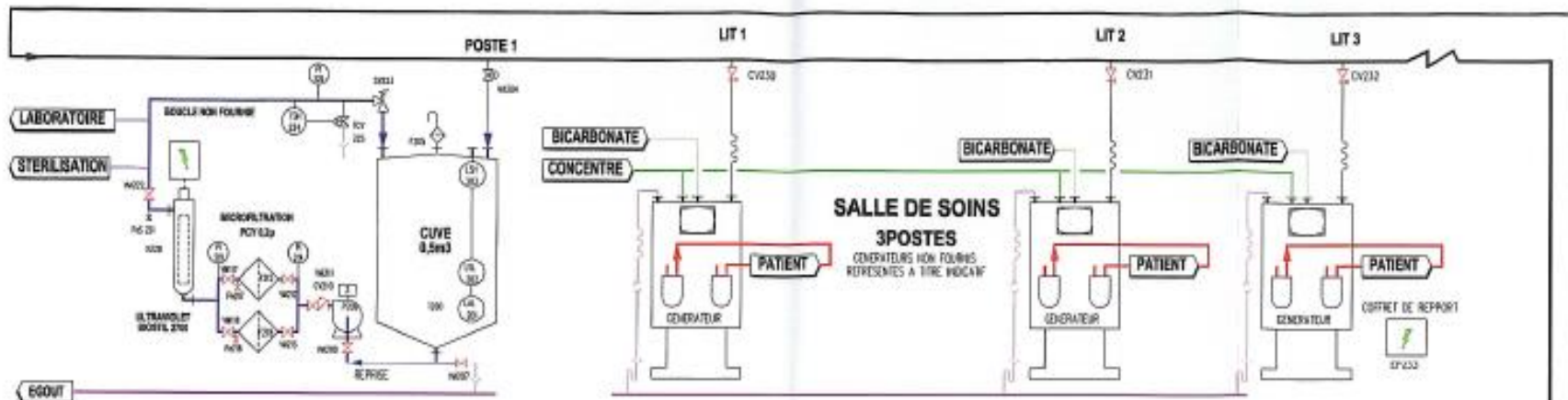
Traitement d'eau : schéma simplifié



- F: Filtre
- C.A: Charbon actif
- UF: Ultrafiltre
- D: Dialyseur(membrane semi perméable)
- G: Générateur de dialyse

Fresenius 5008 H

CH SAINT PIERRE ET MIQUELON



NOTA : LES VANNES REPRESENTES EN ROUGE SONT HORS FOURNITURE

MAI A JUIN	JAN	FEB	MAR	AVR	MAY	JUN	JUL	AUG	SEP
MAI A JUIN	JAN	FEB	MAR	AVR	MAY	JUN	JUL	AUG	SEP
MAI A JUIN	JAN	FEB	MAR	AVR	MAY	JUN	JUL	AUG	SEP

permo

POSTE DE TRAITEMENT D'EAU
CENTRE HOSPITALIER DE
SAINT PIERRE ET MIQUELON

EX10 99 1601 B







Matériel d'ATPmétrie



Les kits QGA-25C*

(Quench-Gone Aqueous-25C)



* Baxter-Gambro

Les kits QGA-25C

(pour 25 tests de mesure du taux de micro-organismes)

Composition	Condition de stockage	Durée de stockage
Luminase Enzyme & solution tampon <i>Réactif Enzyme Luciférase, 3 mL</i>	4 ou 25°C*	6 à 12 mois *
UltraCheck <i>Goutte-à-goutte</i> <i>Solution étalon à 1ng ATP/ml, 2.5 mL</i>	20°C	18 mois
UltraLyse <i>Bouteille</i> <i>Réactif d'extraction du c.ATP, 30 mL</i>	20°C	18 mois
Tubes pré-remplis avec 9 mL d'UltraLute (dilution) <i>Réactif de dilution du c.ATP × 25</i>	20°C	18 mois
Cônes 0.1-1mL, rack de 100	-	-
Cônes 1-200 µL, rack de 96	-	-
Seringues de 60 mL × 25 Avec embout Luer-lok	-	-
Filtres à seringues × 25	-	-
Tubes à luminomètre 2.5 mL × 50	-	-

* Conservation de l'enzyme : 6 mois à température ambiante, 1 an au frigo

Les kits QGA-25C

(Quench-Gone Aqueous-25C)

- **Luminase** réactif du test (*sec + base de dilution*)
- **Ultra-check** : étalonnage standard d'ATP
- **Ultra-lyse** : enzyme d'extraction de l'ATP
- **Ultra-lute** : tampon de dilution de l'ATP extraite
- Seringues de 60 ml + filtres

Pratique des tests : plan de travail

- Pas de courants d'air ou de clim
- Plan de travail propre
- Pas de gants
- SHA
- Faire des séries de 6 à 8 échantillons
 - Numéroté les échantillons
 - Numéroté les tubes Ultalute
 - JAMAIS les tubes Luminase ++
(on les passe dans le lecteur optique !)
 - Analyse immédiate ou différée
(7 jours à 4 ° C possible)



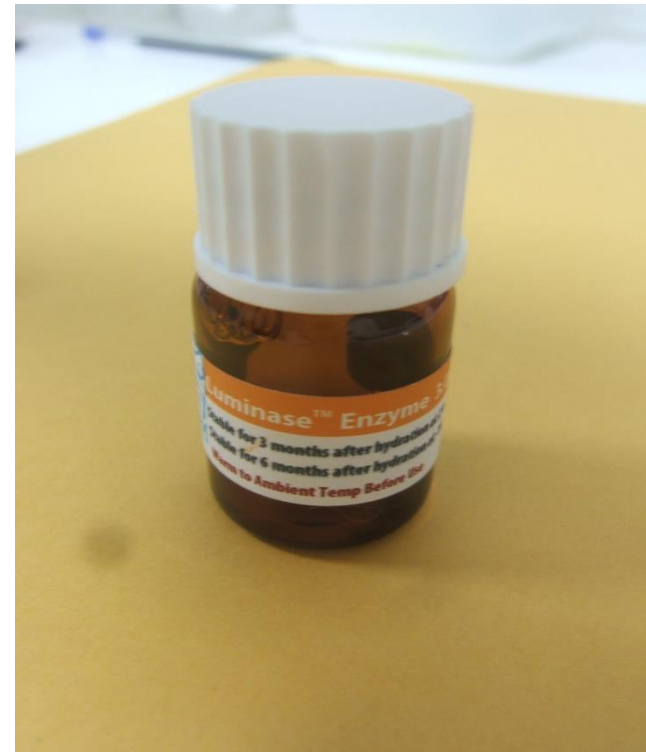
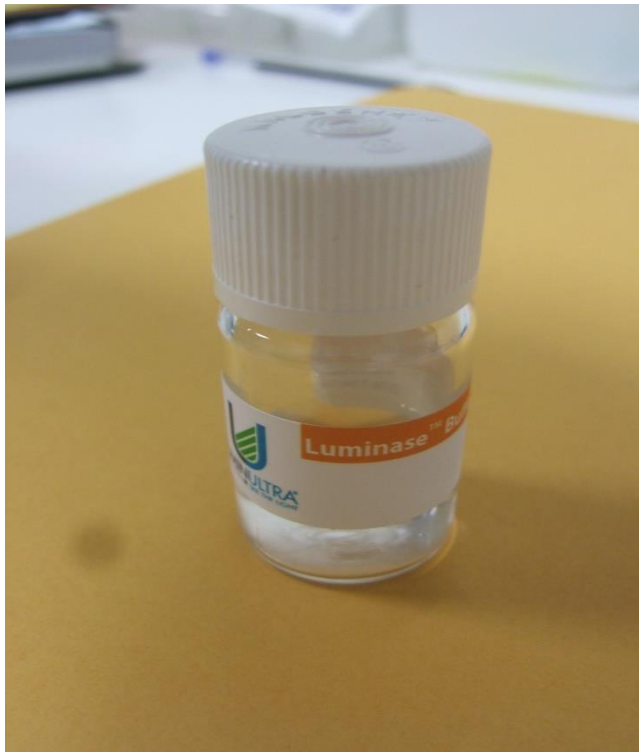
Pratique des tests : plan de travail



Pratique des tests : 1 - préparation

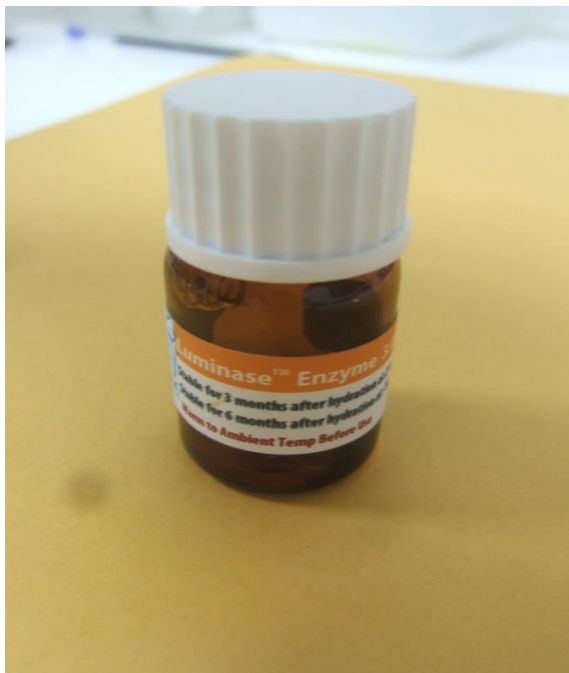
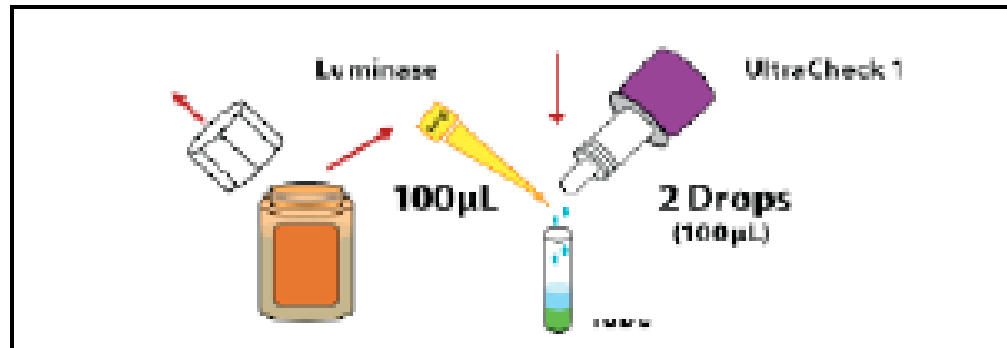
- **Préparer** l'enzyme sans la contaminer le jour de la réalisation des tests
- Enzyme sèche + tampon : **utilisable** après 5 mn
- **Conservation** après réhydratation :
 - 3 mois à 4°
 - 6 mois après congélation
- Enzyme à **utiliser** à température ambiante
 - Sortir du frigo une heure avant les tests

1 - Préparer la Luminase *(reconstituer l'enzyme)*



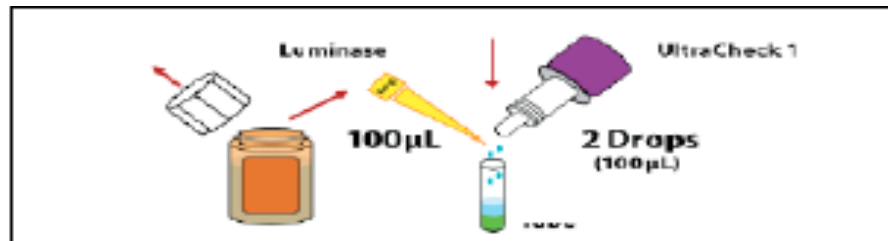
2 - Calibrer avec l'UltraCheck

solution « étalon » (1ng ATP/ml)

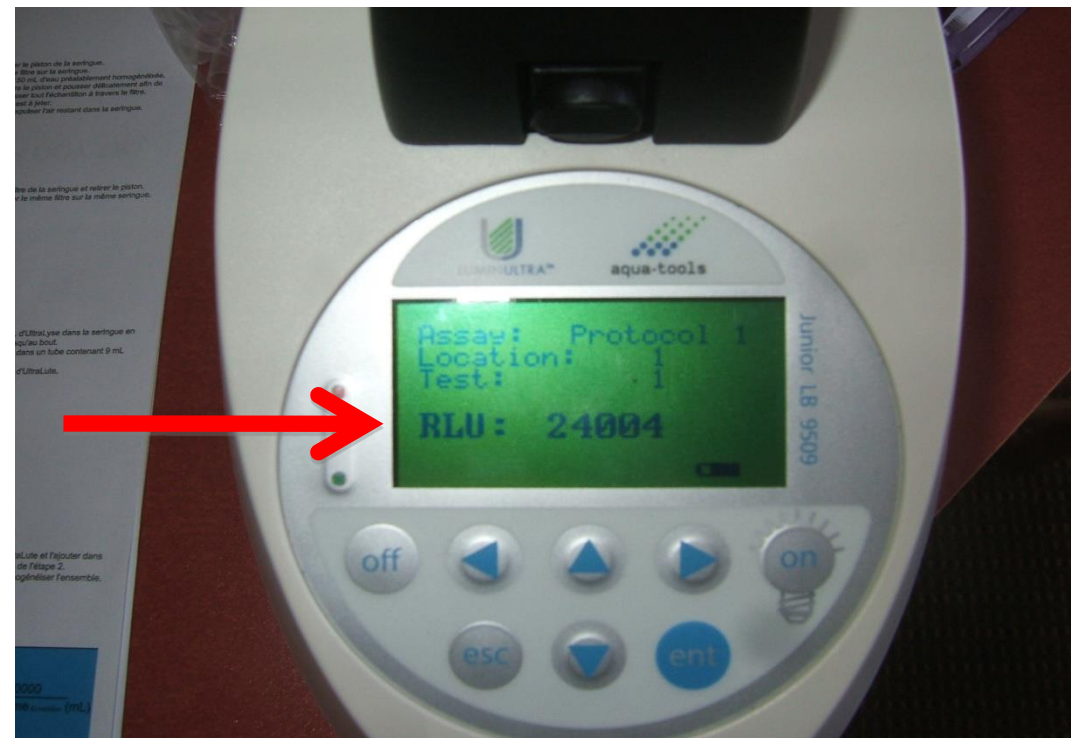


2 - Calibrer avec l'UltraCheck

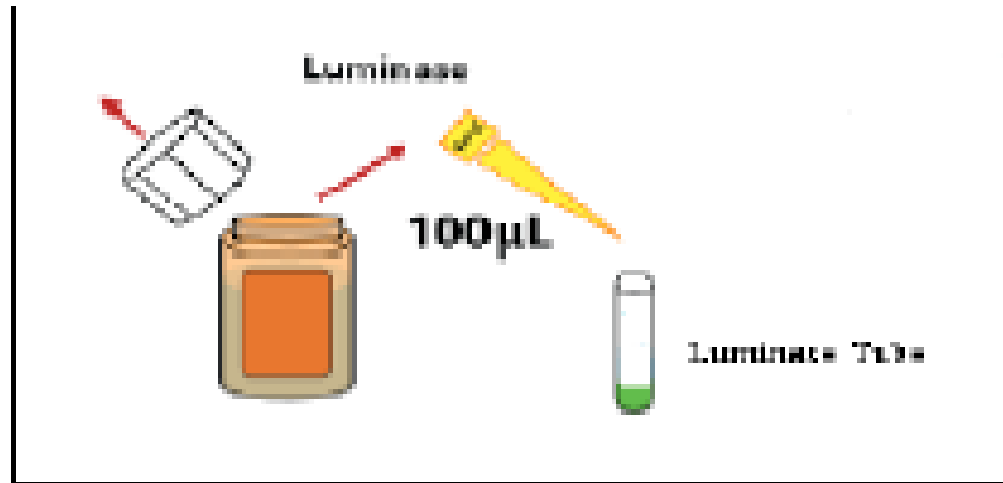
solution « étalon » (1ng ATP/ml)



- RLU = relative light unit
- Si résultat < 5000 RLU
- → Changer de flacon de Luminase
- Calibrer chaque tube de Luminase



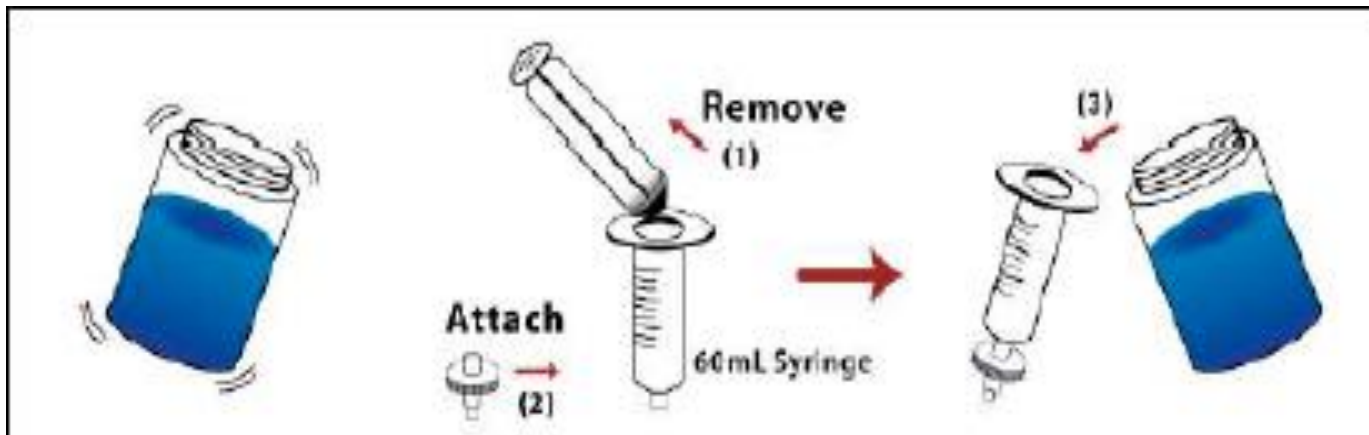
3 - Mesure du « bruit de fond » (la « tare »)



- RLU tube + Luminase = bruit de fond
 - Bruit de fond = bioluminescence présente naturellement dans les matériaux
- Pour chaque échantillon :
 - $\text{RLU corrigé} = \text{RLU mesuré} - \text{RLU « bruit de fond »}$

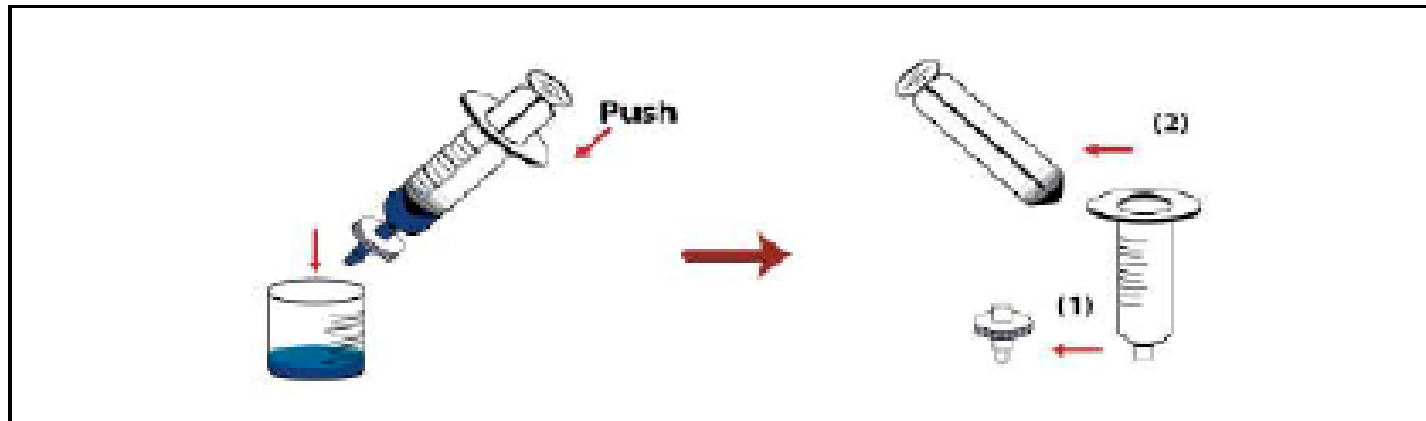
4 - Mesure des échantillons

- Volume de 50 à 100 ml dans flacon stérile
- Seringue + filtre :
 - Fixer le filtre sur la seringue
 - Retirer le piston, verser l'échantillon après agitation pour l'homogénéiser



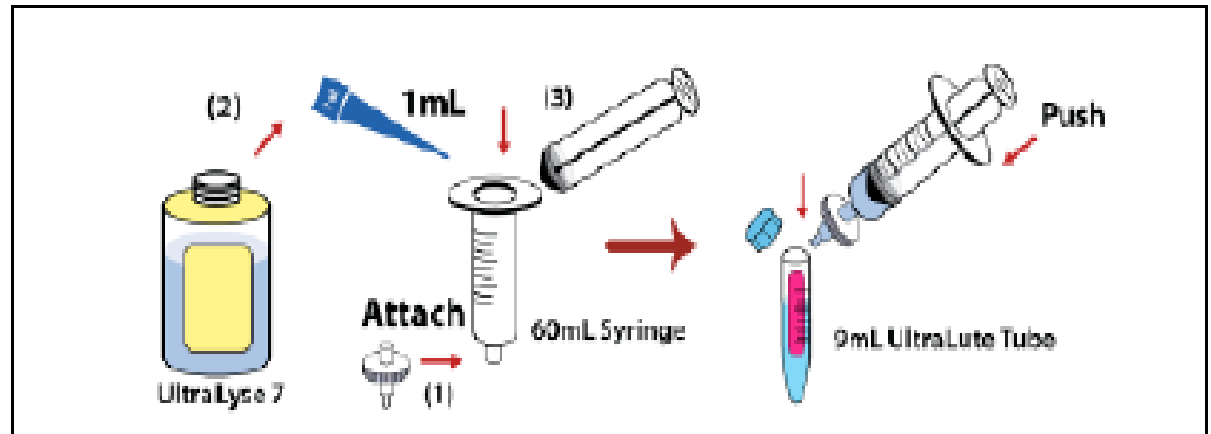
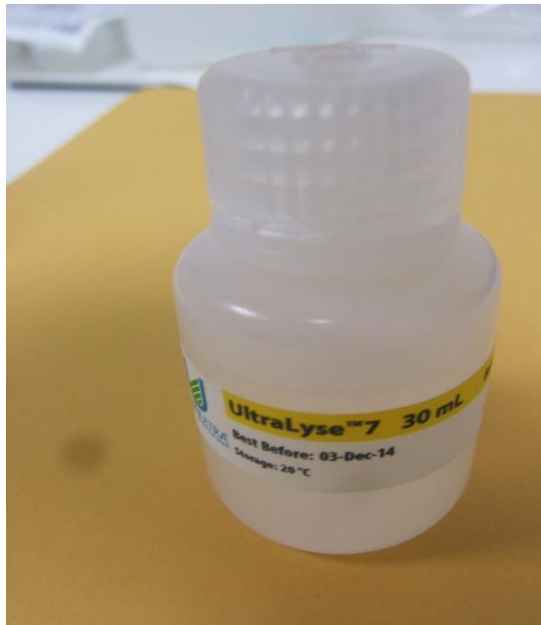
4 - Mesure des échantillons

- 4-1 - Filtration
 - Pousser le piston « délicatement » sans faire passer d'air.
→ Les micro-organismes se retrouvent sur le filtre qui doit rester humide.
 - Noter le volume filtré (sert pour le calcul)



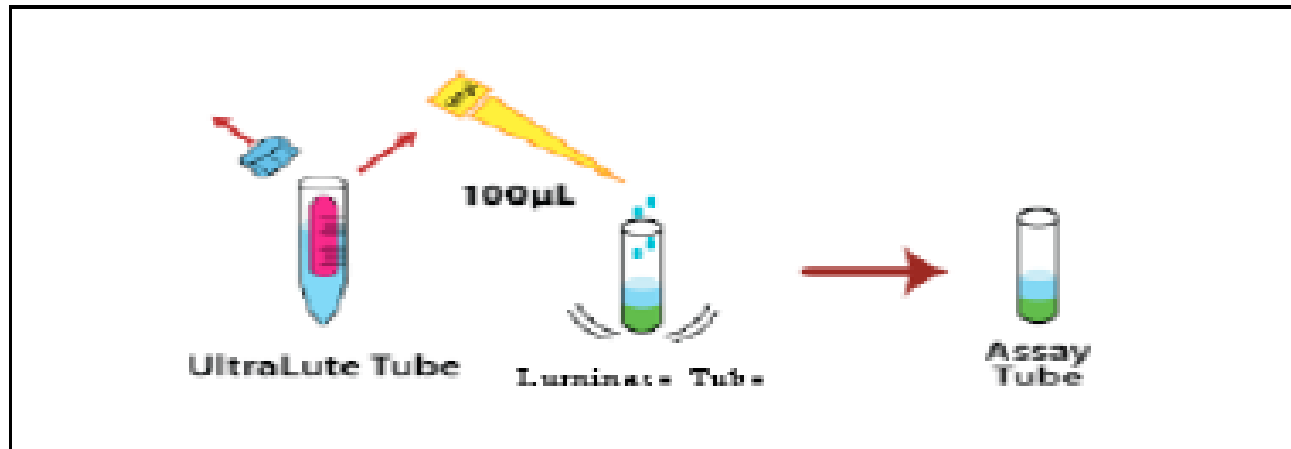
4 - Mesure des échantillons

- 4-2 - Extraction et dilution
 - Même filtre et même seringue :
 - 1000 μ l d'Ultralyse
 - Pousser la seringue + air dans un tube Ultralute
 - Analyse immédiate dans le Luminomètre



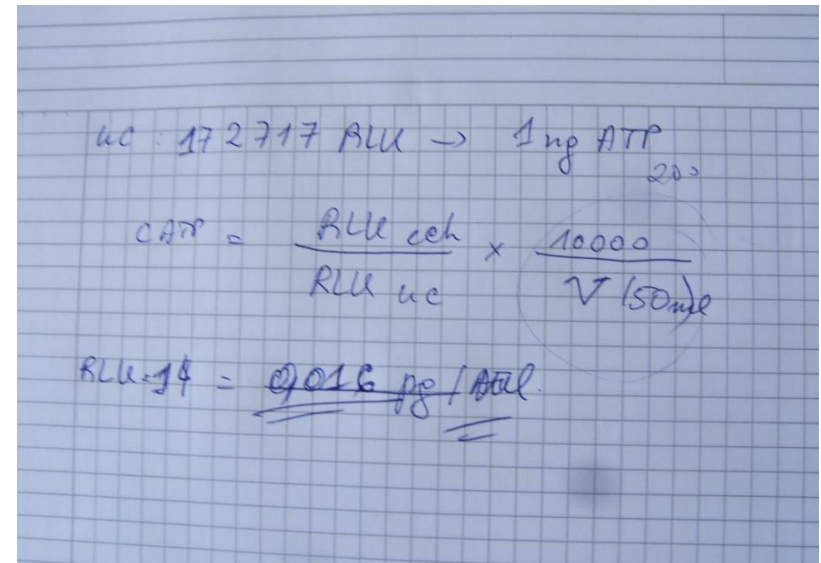
4 - Mesure des échantillons

- 4-3 - Analyse de l'échantillon
 - Transfert de 100 µl du tube Ultralute dans un petit tube Luminase
 - Homogénéiser puis lecture dans le luminomètre
 - La valeur est RLU « mesuré »
 - Valeur pour le calcul : $RLU \text{ mesuré} - RLU \text{ « bruit de fond »} = RLU \text{ corrigé}$

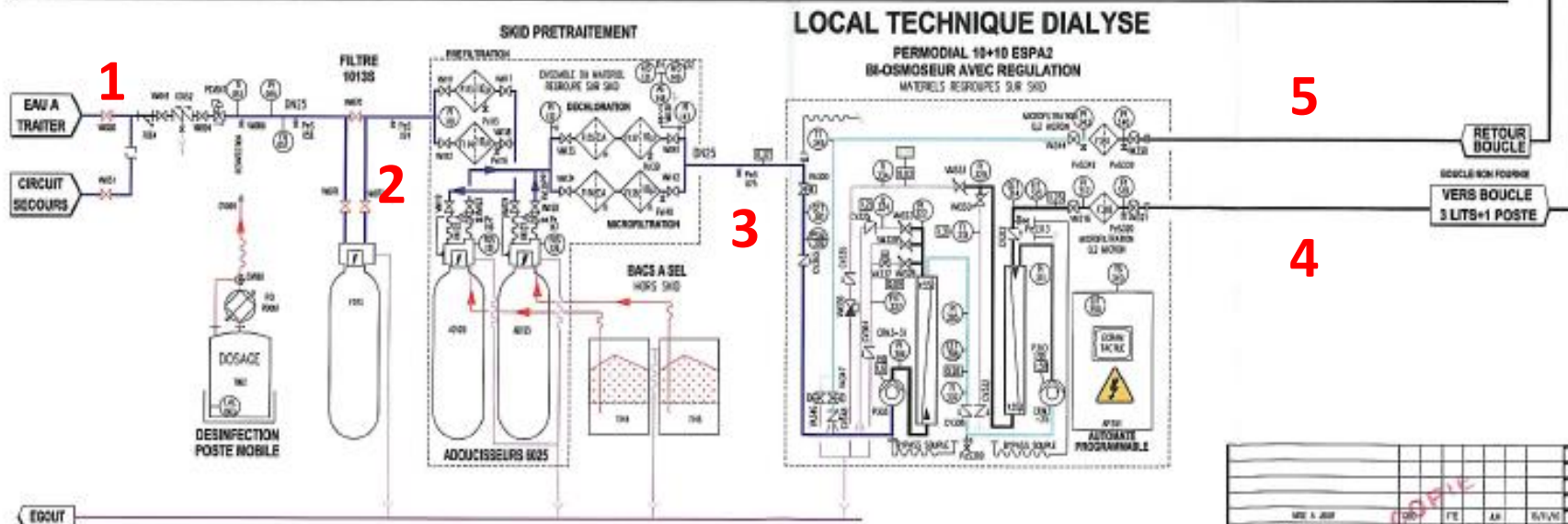
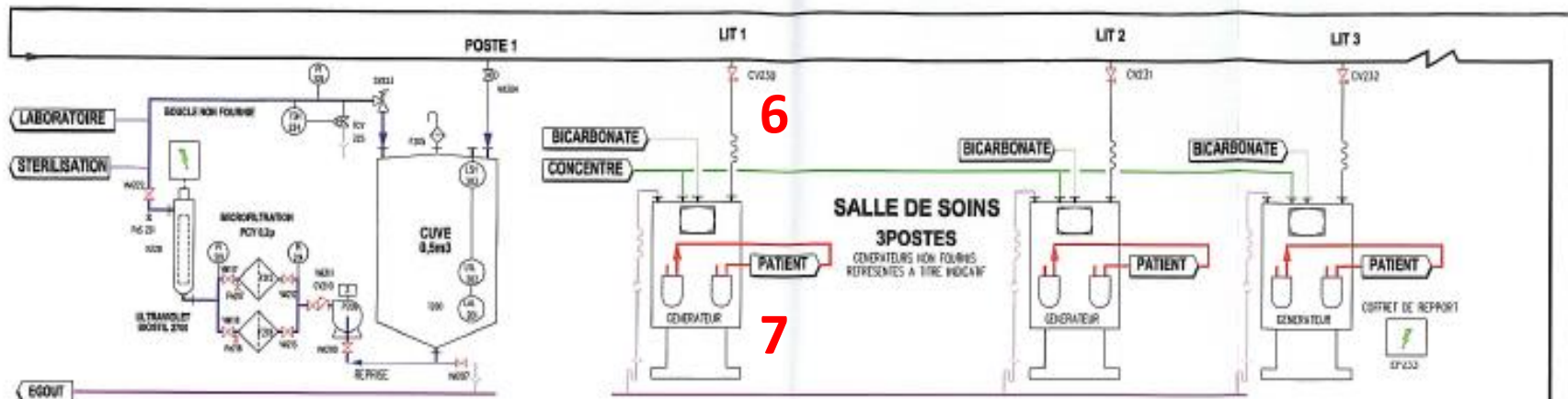


5 - Calcul et interprétation des résultats

- Conversion RLU en ATP
 - $cATP \text{ (pg/ml)} = \frac{RLU \text{ corrigé}}{RLU \text{ étalon}} \times 10.000 \text{ (pg ATP)} / V \text{ échantillon ml}$
 - Volume = 50 ml en général
 - $cATP \text{ (EM/ml)} = cATP \text{ (pg/ml)} \times 1000$
 - EM : équivalent microorganisme
- 1 pg ATP = 1000 μ organismes (pico = 10^{-12})
- 1 fg ATP = 1 E. Coli (femto = 10^{-15})



CH SAINT PIERRE ET MIQUELON



NOTA : LES VANNES REPRESENTES EN ROUGE SONT HORS FOURNITURE

MAI	JUN	JUL	AUG	SEPT	OCT	NOV	DEC

permo

POSTE DE TRAITEMENT D'EAU
CENTRE HOSPITALIER DE
SAINT PIERRE ET MIQUELON

EX10 99 1601 B

Cartographie n° 1

N° pré	Site	RLU éch	Bruit de fond	RLU corrigé	cATP pg/ml	cATP EM
1	Eau brute	399	3	396	3.288	3288
2	Après filtre à sable	330	3	327	2.715	2715
3	Après prétt	268	3	265	2.20	2200
4	Départ boucle	20	3	17	0.141	141
5	Retour boucle	15	3	12	0.099	99
6	Dialysat	24	3	21	0.174	174
7	Soluté compensation 5008	13	3	10	0.083	83
8	Aqua-Uno	16	3	13	0.107	107

RLU calibration : 24081

Cartographie n° 2

N° pré	Site	RLU éch	Bruit de fond	RLU corrigé	cATP pg/ml	cATP EM
1	Eau brute	423	3	420	3.61	3610
2	Après filtre à sable	333	3	330	2.8	2800
3	Après prétt	427	3	424	3.65	3650
4	Départ boucle	4	3	1	0.008	8
5	Retour boucle	16	3	13	0.112	112
6	Dialysat	10	3	7	0.0431	43
7	Soluté compensation 5008	18	3	15	0.008	8
8	Aqua-Uno	16	3	13	0.026	26

RLU calibration : 23208

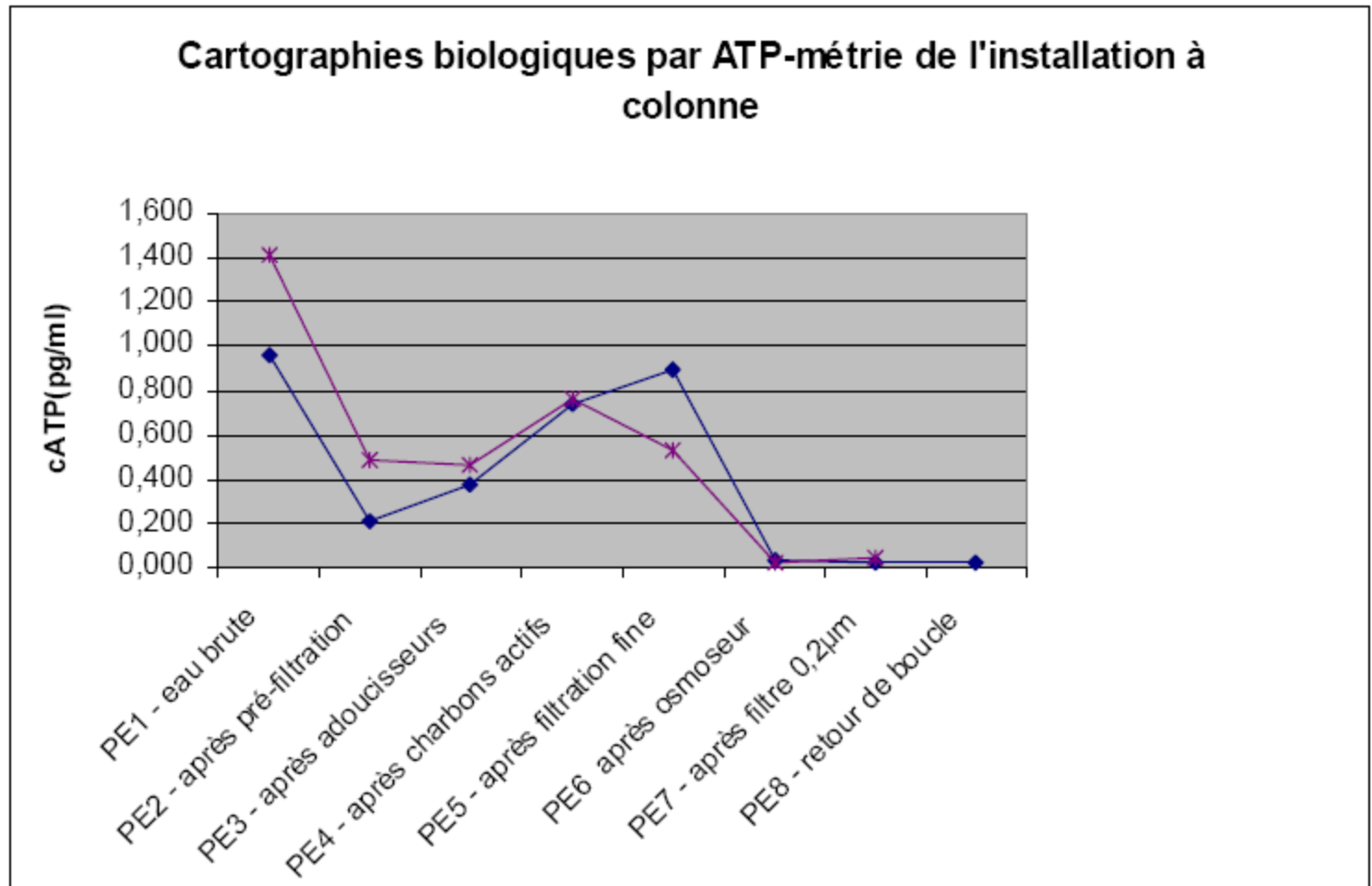
Cartographie n° 3 (eau brute au CHFD)

N° pré	Site	RLU éch	Bruit de fond	RLU corrigé	cATP pg/ml	cATP EM
1	Eau brute Salle ttt eau	423	3	420	3.61	3610
2	Eau brute lavabo bloc op	10769	15	10754	92.8 (2)	92800
3	Eau brute salle dialyse (branchement Aqua- uno)	1116	15	1101	9.6 (2)	9600
8 rappel	Aqua-Uno	16	3	13	0.026	26

RLU calibration 1 : 23208

RLU calibration 2 : 23160

Cartographies biologiques d'une installation de traitement de l'eau en dialyse



CHFD : suivi microbiol eau de dialyse

novembre 2016

N° éch.	Nature	Site	Type	Unité	Seuil	Avril	Mai	Juin	Juillet	Aout	Sept.	
1	Eau brut	Station d'eau	Bactério	cATP pg/ml	-	1,58					4,08	
2	Filtre à sable	Station d'eau	Bactério	cATP pg/ml	-							
	Après adoucisseur										30,63	
3	Pré-traitement	d'eau	Bactério	cATP pg/ml	-	19,71					39,4	
4	Eau osmosée (départ)	Station d'eau	Bactério	cATP pg/ml	<0,1	0					0	
			Endotoxine	EU/ml	<0,25	<0,010					<0,010	
5	Eau osmosée (retour)	Station d'eau	Bactério	cATP pg/ml	<0,1	0					0,04	
			Endotoxine	EU/ml	<0,25	<0,010					<0,010	
6	Eau osmosée Service de dialyse	Box 1	Bactério	cATP pg/ml	<0,1	0						
			Endotoxine	EU/ml	<0,25	<0,010						
		Box n°2	Bactério	cATP pg/ml	<0,1	0						
			Endotoxine	EU/ml	<0,25	<0,010						
		Box 3	Bactério	cATP pg/ml	<0,1	0,04						
			Endotoxine	EU/ml	<0,25	<0,010						
		Box 4	Bactério	cATP pg/ml	<0,1	0,03						
			Endotoxine	EU/ml	<0,25	<0,010						
		Box 5	Bactério	cATP pg/ml	<0,1	0,020						0,020
			Endotoxine	EU/ml	<0,25	<0,019						<0,011
7	Dialysat ultrapur	Générateur 570	Bactério	cATP pg/ml	<0,1	0,039					0,07	
			Endotoxine	EU/ml	<0,25	<0,016					<0,010	
		Générateur X04	Bactério	cATP pg/ml	<0,1	0,07						0
			Endotoxine	EU/ml	<0,25	<0,01						<0,016
		Générateur 571	Bactério	cATP pg/ml	<0,1	0,04						0
			Endotoxine	EU/ml	<0,25	<0,01						<0,010
		Générateur 569	Bactério	cATP pg/ml	<0,1	0						0,04
			Endotoxine	EU/ml	<0,25	<0,01						<0,010
		Générateur X05	Bactério	cATP pg/ml	<0,1	0,318						0
			Endotoxine	EU/ml	<0,25	<0,010						<0,014

Cartographie n° 4 – année 2016

EM / ml

N° pré	Site	avril	septembre
1	Eau brute	1580	4060
2	Après adouciss		30630
3	Après préttt	19710	39400
4	Départ boucle	0	0
5	Retour boucle	0	40
6	Dialysat	40	43
7	Soluté compensation 5008	2160	20
8	Aqua-Uno	1250	50

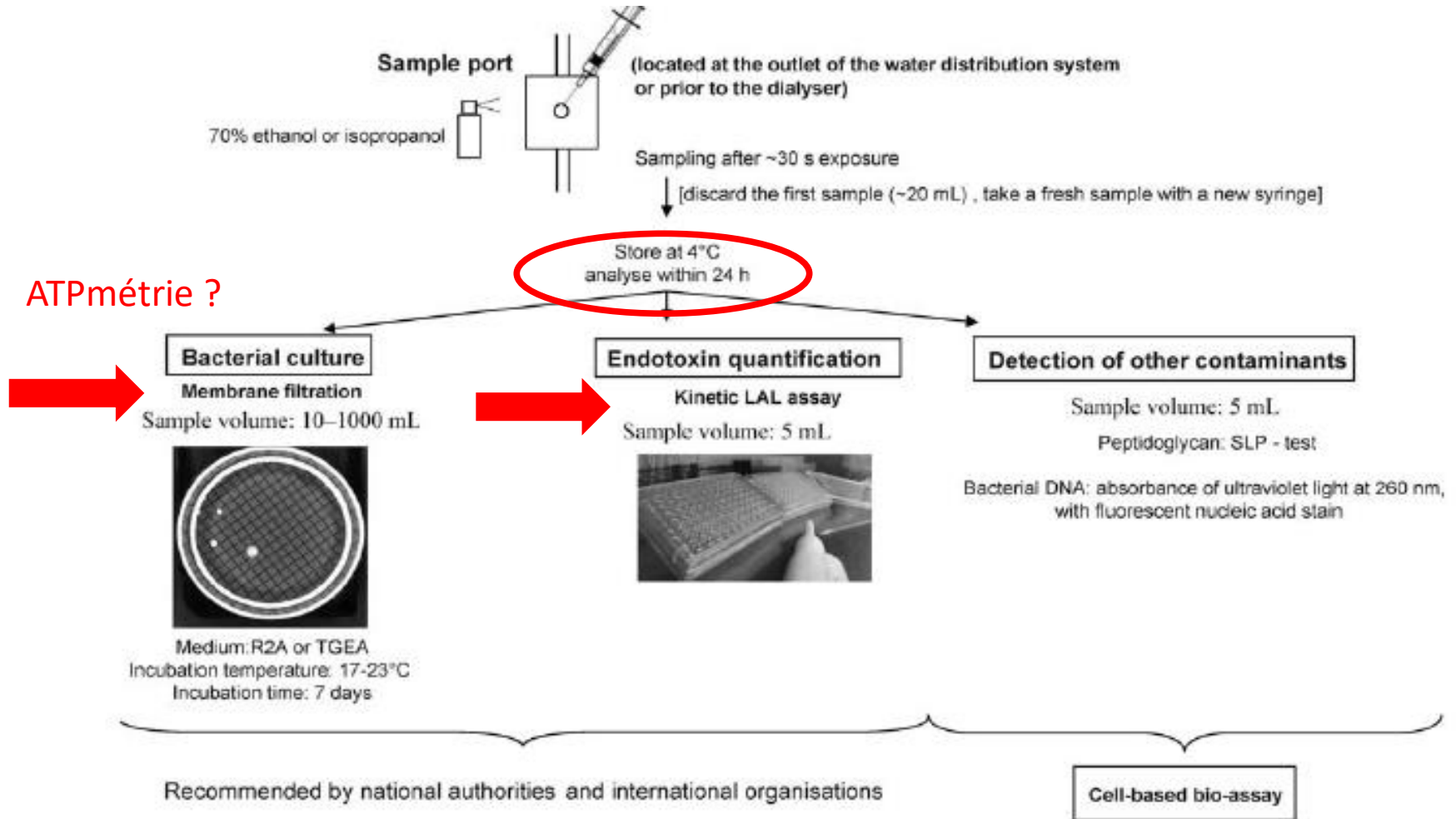
CHFD : suivi des non conformités novembre 2016

N° Ech.	0) Nature	Bacterio (cATP Pg/ml) ou endotoxine	0) Echantillon non conforme		Action corrective	Nouvelle valeur	
			Date	Valeur		Date	Valeur
Générateur 4653	Dialysat ultrapur	<0,1	29/01/2016	0,118	désinfection appareil le 01/02/2016	01/02/2016	0,09
Aqua Uno	Eau osmosée	<0,1 cATP pg:ml	04/04/2016	1,25	Nouveau prélèvement	05/04/2016	0,46
Aqua Uno	Eau osmosée	<0,1 cATP pg:ml	05/04/2016	0,46	Désinfection appareil le 06/04/2016 + changement filtre	07/04/2016	0,03
Générateur X05	Dialysat ultrapur	<0,1	06-avr	0,318	Nouveau prélèvement	07/04/2016	0,06
Générateur X05	Solution de restitution	<0,1	06/04/2016	0,216	Nouveau prélèvement	07/04/2016	0
Après pré- traitement	Eau osmosée		04/04/2016	19,71	Changement des filtres - modification du pré-traitement	20/04/2016	1,16
Eau de ville	Eau brute		04/04/2016	1,57	Prélevé pour comparaison avec l'"après" pré traitement	20/04/2016	7,89
Aqua Uno	Eau osmosée	<0,1	15/04/2016	>100ufe/ml	Retour résultats BioClin prélèvement du 15/04/2016, reçu le 26/04	26/04/2016	0,07
Analyses de septembre	Analyses de septembre		07/09/2016		Réalisées juste avant le changement programmé des filtres		

Eau pour hémodialyse

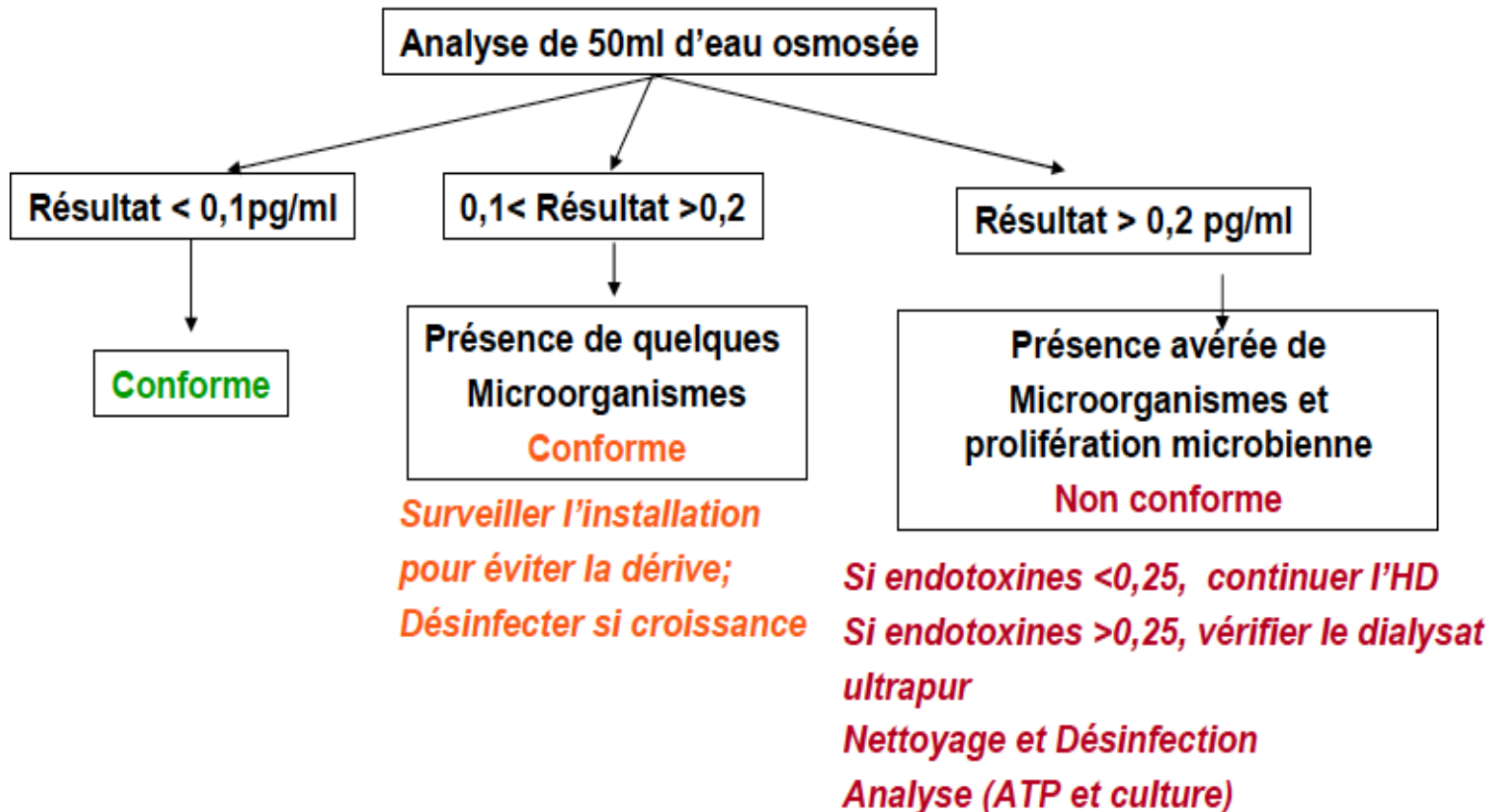
- Eau de dialyse (osmosée)
 - < 100 UFC / ml soit < 100 EM / ml
 - Endotoxines < 0.25 UE / ml
- Eau ultrapure
 - Pas de contamination bactérienne
 - < 10 germes / litre d'eau soit $< 0,1$ UFC / ml
 - Endotoxines indétectables au LAL
 - Seuil de détection : $0,005$ UE / ml

Eau pour HD à SPM



Conclusion

Arbre décisionnel: Eau osmosée en HD et HDF Dialysat standard



Fiche mémo ATPmétrie



1) CALIBRATION

L'étape de calibration est à réaliser par série d'échantillon.

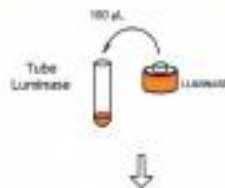


Placer le tube dans le luminomètre.

Mesure

La valeur mesurée est appelée RLU UltraCheck.
Noter cette valeur.

2) PREPARATION DU TUBE LUMINASE ET MESURE DU BRUIT DE FOND



Placer le tube dans le luminomètre.

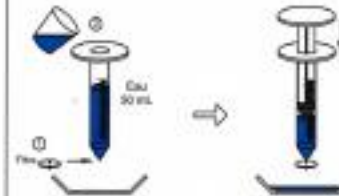
Mesure

La valeur mesurée est appelée RLU Tube Luminase.
Noter cette valeur et garder le tube pour l'étape 3.3

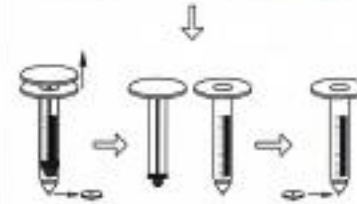


3) L'ANALYSE DE L'ECHANTILLON

3.1 FILTRATION:

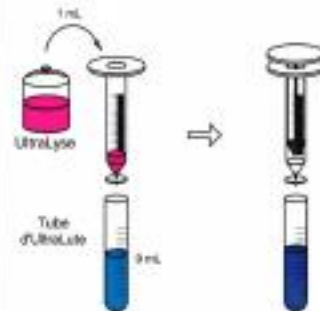


- Enlever le piston de la seringue.
- Fixer le filtre sur la seringue.
- Verser 50 mL d'eau préalablement homogénéisée.
- Remettre le piston et pousser délicatement afin de faire passer tout l'échantillon à travers le filtre.
- Le filtrat est à jeter.
- Ne pas expulser l'air restant dans la seringue.



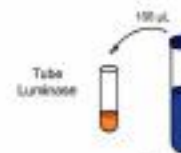
- Détacher le filtre de la seringue et retirer le piston.
- Ensuite, relier le même filtre sur la même seringue.

3.2 EXTRACTION ET FILTRATION:



- Ajouter et filtrer 1 mL d'UltraLyse dans la seringue en poussant le piston jusqu'au bout.
- Le filtrat est récupéré dans un tube contenant 9 mL d'UltraLube.
- Homogénéiser le tube d'UltraLube.

3.3 LECTURE DU RESULTAT:



Placer le tube dans le luminomètre.

Mesure

La valeur mesurée est appelée RLU Tube échantillon.
Noter cette valeur.

- Prélever 100 µL du tube d'UltraLube et l'ajouter dans le tube contenant la Luminase de l'étape 2.
- Tapoter doucement afin d'homogénéiser l'ensemble.

3.4 CALCULS:

$$cATP \text{ (pg/mL)} = \frac{RLU_{\text{échantillon}}}{RLU_{\text{Luminase}}} \times \frac{10000}{\text{Volume}_{\text{échantillon}} \text{ (mL)}}$$

$$EM \text{ / mL} = cATP \text{ (pg/mL)} \times 1000$$

Conclusion

- Méthode fiable et reproductible
- Apprentissage simple
- Utile pour Dg « nomade » immédiat
- Pour le suivi de structures isolées



MERCI !