

# Occurrence de *Pseudomonas aeruginosa* dans les réseaux intérieurs : présentation d'un protocole adapté à la collecte du biofilm présent dans la robinetterie sanitaire

Romain BÉNESTEAU, Coline PESSEREAU et Nathalie GARREC

Département CAPE/AQUASIM, Centre Scientifique et Technique du Bâtiment, 11 rue Henri Picherit, BP 82341, 44323 Nantes Cedex 3, France

\*Auteur de correspondance : Nathalie Garrec, nathalie.garrec@cstb.fr

**Résumé** – *Pseudomonas aeruginosa* est une bactérie environnementale avec un tropisme particulier pour l'environnement hydrique. On la retrouve dans tous les types d'eau et notamment dans l'eau potable distribuée. Actuellement, il n'existe pas de valeur réglementaire pour ce micro-organisme dans les eaux destinées à la consommation humaine non conditionnées et il n'existe aucune preuve que l'usage normal d'eau de boisson contaminée par *P. aeruginosa* puisse être une source d'infection par voie orale pour la population générale. En revanche, pour les établissements de santé, le problème est tout autre puisque cette bactérie est un pathogène opportuniste majeur, responsable de 10 % des infections nosocomiales et que le réseau hydrique à l'intérieur du bâtiment est suspecté d'être une source et un réservoir de *P. aeruginosa*. Bien que le niveau cible à atteindre soit l'absence de *P. aeruginosa* au point d'usage, plusieurs études montrent que 4,5 à 97 % des échantillons d'eau prélevés dans des services de réanimation sont contaminés par *P. aeruginosa*. La contamination de l'eau pourrait s'expliquer par des phénomènes de rétro-contamination et de colonisation du biofilm au niveau des robinets et des antennes terminales de distribution. Afin de mieux caractériser les populations de *P. aeruginosa* présentes au sein des biofilms de réseaux intérieurs, nous avons mis au point un protocole de décrochage du biofilm à partir d'éléments de robinetterie. Le protocole consiste à remplir le robinet, préalablement démonté du point d'usage, d'un mélange constitué d'eau stérile et de billes de verre borosilicaté (10:2) et à le soumettre à une agitation mécanique pendant 3 min. La composition microbiologique du biofilm ainsi décroché peut ensuite être étudiée.

**Mots-clés** : *Pseudomonas aeruginosa*, eau du robinet, biofilm

**Abstract** – Occurrence of *Pseudomonas aeruginosa* in drinking water networks: a protocol adapted to the sampling of biofilm in faucet.

*Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic pathogen that naturally occurs in aquatic environments. This bacterium is adapted to oligotrophic environmental conditions and could be detected in drinking water systems. Although, water for human consumption is required to be free of any bacteria that might pose a health risk, *P. aeruginosa* is not included in parameters to be analysed and in a recent report the ANSES concludes that there is no proof that the normal use of contaminated drinking water can be a source of infection by oral route in the general population. This bacterium is mostly harmless for healthy people but must be regarded as a relevant opportunistic pathogen for sensitive human population especially for hospitalized people in intensive care unit. This bacterium is responsible for almost 10% of the hospital-borne infections and drinking water network inside the building is suspected to be a source and a reservoir of *P. aeruginosa*. Although the target level to achieve is the absence of *P. aeruginosa* at terminal point-of-use, several studies showed that 4.5 in 97% of water samples taken in intensive care units are contaminated by *P. aeruginosa*. The origin of patients' contamination remained discussed but among exogenous sources of contamination, tap water is often suspected to be a source and a reservoir for these opportunistic pathogens. Nevertheless control strategies are limited for drinking water and recurrent contamination of tap water remained unsolved. Water contamination could be explained by retrograde contamination and by colonization of taps. To better characterize the populations of *P. aeruginosa* present in biofilm drinking water networks, we developed a protocol to sample biofilm from taps. Assays were performed on biofilms established inside taps and on the surface of tap swirls. Mechanical action of glass beads was compared with swabbing

and proved to have more efficiency in sampling biofilm on surface of tap swirls. The protocol was then adapted to sample biofilm in faucets. It consists in filling the tap to study with a mixture of sterile distilled water and borosilicate glass beads of 1 mm in diameter and then to perform a mechanical shaking of 3 minutes with a vortex. This protocol will be used to collect biofilm on terminal point-of-use and to compare occurrence of *P. aeruginosa* in this type of biofilm and in the biofilm established on plumbing material.

**Keywords:** *Pseudomonas aeruginosa*, tap water, biofilm

## 1. INTRODUCTION

*Pseudomonas aeruginosa* est une bactérie à Gram négatif qui présente un tropisme particulier pour le milieu hydrique et qui peut être détectée dans les eaux destinées à la consommation humaine. D'après les données recueillies dans la base SISE-Eaux (ANSES, 2010), la prévalence de *P. aeruginosa* est de 3,2 % (2085 échantillons de 100 mL d'eau du robinet). Pour les échantillons positifs, la médiane des concentrations mesurées est de 8 ufc.100 mL<sup>-1</sup> et le maximum est de  $2,2 \times 10^3$  ufc.100 mL<sup>-1</sup> (cas isolé). D'après l'ANSES, il n'existe aucune preuve que l'usage normal d'eau de boisson contaminée par *P. aeruginosa* puisse être une source d'infection par voie orale dans la population générale et il n'est pas utile d'introduire une valeur paramétrique pour cette bactérie dans l'eau de distribution publique. Si *P. aeruginosa* est une bactérie inoffensive pour les personnes en bonne santé, elle est néanmoins décrite comme un pathogène clinique majeur. D'après l'enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales réalisée en 2001 (INVS, 2009), cette bactérie est responsable de 10 % des infections acquises à l'hôpital derrière *E. coli* et *S. aureus*. Dans les services de réanimation ; c'est en outre, le micro-organisme le plus fréquemment isolé derrière *S. aureus* et *E. coli*. La contamination des patients peut avoir une origine endogène (présence de la bactérie dans la flore du patient) dans 40 à 95 % des cas, ou exogène (environnement) dans 5 à 60 % des cas (Blanc *et al.*, 2007). Parmi les sources exogènes, l'environnement hydrique est suspecté de jouer un rôle non négligeable dans la transmission de la bactérie. Ainsi plusieurs auteurs ont réalisé des suivis de la contamination des points d'eau au sein de services de réanimation sur quelques mois ou quelques années et ont comparé les souches isolées de l'eau ou des robinets avec les souches cliniques (Blanc *et al.*, 2007 ; Blanc, 2004 ; Cuttelod *et al.*, 2010 ; Lashéras *et al.*, 2006 ; Leroyer, 2011 ; Rogues *et al.*, 2007 ; Vallés *et al.*, 2004). Le pourcentage de prélèvements d'eau du robinet contaminés par *P. aeruginosa* varie de 2 à 62 % selon les études (Blanc *et al.*, 2007 ; Blanc, 2004 ; Cuttelod *et al.*, 2010 ; Lashéras *et al.*, 2006 ; Leroyer, 2011 ; Rogues *et al.*, 2007 ; Vallés *et al.*, 2004). Les isolats détectés dans l'eau sont identiques à des isolats

cliniques dans 16 à 90 % des études (Blanc, 2004 ; Cuttelod *et al.*, 2010 ; Vallés *et al.*, 2004). Malgré ces observations, il est souvent difficile de déterminer si les patients ont été contaminés par l'eau du robinet ou si les robinets ont eux-mêmes été contaminés à la suite de rétro-contamination. Par ailleurs de nombreuses questions se posent concernant la dynamique d'implantation de *P. aeruginosa* dans les réseaux d'eau et sur les facteurs favorisant sa persistance. Plusieurs arguments sont en faveur d'une localisation distale avec une implantation de la bactérie au niveau du biofilm des antennes terminales et plus particulièrement des points d'usage (Lashéras *et al.*, 2006 ; Rogues *et al.*, 2007 ; Blanc *et al.*, 2004 ; van der Mee-Marquet, 2005). Ainsi, Lashéras *et al.* (2006) montrent que la contamination des points d'eau dans un service de réanimation du CHU de Bordeaux est de 16,2 % mais que cette contamination n'est en revanche pas observée en amont et en aval de la canalisation principale. La contamination des points d'eau par *P. aeruginosa* est décrite comme étant pratiquement impossible à éradiquer et est souvent vécu comme une fatalité du fait du tropisme particulier de la bactérie pour l'environnement hydrique et sa capacité à former des biofilms dans les canalisations (Petignat *et al.*, 2006). Néanmoins certains exemples montrent que les actions entreprises sur le réseau permettent d'agir sur cette contamination qu'il s'agisse d'actions préventives ou correctives (Cuttelod *et al.*, 2010 ; Lashéras *et al.*, 2006 ; van der Mee-Marquet, 2005). Afin d'optimiser les mesures de prévention et les procédures de nettoyage et désinfection, il est indispensable de localiser précisément les zones de développement des biofilms de *P. aeruginosa*. Cette localisation, sur l'ensemble du réseau ou spécifique à certaines zones, dépend notamment de l'origine de la souche c'est-à-dire si celle-ci a été véhiculée par l'eau du compteur au point d'usage ou si elle a été apportée par l'utilisateur du robinet. Pour cela, nous avons souhaité développer un outil de décrochage du biofilm présent à l'intérieur de la robinetterie sanitaire, permettant d'avoir accès à la fraction adhérente de la population, qui n'est pas nécessairement représentée dans les prélèvements d'eau, même au premier jet. Cet outil nous permettra ensuite de faire des comparaisons d'occurrence de la bactérie dans le biofilm des canalisations et dans le biofilm des points d'usage.

**Tableau I.** Caractéristiques des robinets utilisés dans cette étude.**Table I.** Characteristics of taps used in this study.

Numéro du robinet	Photo	Type	Contenance	Revêtement interne
1		Mitigeur	30 mL	Rugueux
2		Mitigeur (bain-douche)	50 mL	Rugueux
3		Mitigeur temporisé	40 mL	Rugueux
4		Mitigeur à commande électronique	90 mL	Rugueux
5		Robinet mélangeur	50 mL	Lisse

## 2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 2.1. Souche bactérienne et milieux de culture utilisés

Les essais ont été réalisés avec la souche *P. aeruginosa* ATCC 10145. La souche a été conservée sur cryobilles (AES-Chemunex, Bruz, France) à  $-80^{\circ}\text{C}$ . Avant chaque ensemencement, la souche a été cultivée à partir d'une cryobille sur gélose CN (AES-Chemunex, Bruz, France), puis une colonie a été utilisée pour ensemencer un bouillon TSB. Après une incubation de 4 h à  $36^{\circ}\text{C}$ , les suspensions ont été utilisées pour ensemencer les éléments de robinetterie (aérateurs ou robinets). Les dénombrements de *P. aeruginosa* dans les échantillons d'eau et de biofilm ont ensuite été réalisés après dilutions successives au  $1/10^{\circ}$  dans de l'eau distillée et étalement de 0,1 mL sur gélose CN, suivi de 24 h d'incubation à  $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ . La flore totale aérobie revivable a été dénombrée sur gélose PCA sans glucose (AES-Chemunex, Bruz, France) par la technique d'ensemencement par inclusion après 7 jours d'incubation à  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

### 2.2. Éléments de robinetterie sanitaire utilisés

#### 2.2.1. Aérateurs

Au total, 8 aérateurs de type de diamètre 24 et disposant d'une ACS (ACS 23.09.10) ont été utilisés.

#### 2.2.2. Robinets

Afin de mettre au point un protocole de décrochage du biofilm, quatre robinets différents ont été utilisés dans cette étude. Leurs caractéristiques sont présentées dans le tableau I. La nature du revêtement interne de ces robinets n'est pas connue précisément et la rugosité diffère de l'un à l'autre. Les robinets ont été utilisés après suppression de tous les flexibles de raccordement et les orifices ont été obturés à l'aide de bouchons en paraffine. Les aérateurs ont été démontés pour permettre le remplissage des robinets. Une fois les aérateurs repositionnés, ils ont été recouverts de parafilm<sup>®</sup> pour assurer l'étanchéité lors des manipulations. Le robinet 5 a été utilisé pour tester le protocole sur un biofilm naturel. Il s'agit d'un robinet mélangeur avec une surface interne lisse.

### 2.3. Mode de contamination

Les 8 aérateurs ont été placés dans des flacons de 10 mL et 1 mL d'une suspension de *P. aeruginosa* ATCC 10145 qui a été déposé sur la surface interne de chacun d'eux. Afin d'assurer l'adhésion des bactéries, les aérateurs ont été placés dans une étuve à  $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Après une nuit d'incubation, le milieu de culture a été éliminé et remplacé par de l'eau du robinet. Les aérateurs ont été maintenus à la

même température pendant 4 jours et l'eau a été renouvelée quotidiennement. Les robinets ont été remplis avec une suspension de *P. aeruginosa* ATCC 10135 obtenue dans les conditions mentionnées ci-dessus et du milieu TSB stérile dans les proportions 1:2. Les robinets ont ensuite été placés dans une étuve à  $35 \pm 2$  °C pendant une nuit. Après élimination de la suspension, les robinets ont été rincés deux fois de manière à éliminer les bactéries planctoniques. Ils ont ensuite été entièrement remplis avec de l'eau de ville et placés dans une étuve à  $22 \pm 2$  °C pendant plusieurs jours. Le renouvellement de l'eau a été assuré quotidiennement à l'exception des week-ends et le suivi des concentrations en *P. aeruginosa* et flore aérobie revivifiable dans l'eau et le biofilm a été assuré après 4, 14 et 30 jours.

## 2.4. Décrochage de biofilm

### 2.4.1. Aérateurs

Afin d'évaluer la pertinence de la méthode de décrochage du biofilm par action mécanique de billes de verre, une première série de tests a été réalisée sur des aérateurs. Les prélèvements de biofilms ont été réalisés à l'aide d'écouvillons ou par action mécanique de billes de verre. Les biofilms ont été préparés dans les conditions décrites ci-dessus, simultanément sur 8 aérateurs. Ils ont été collectés à l'aide d'écouvillons SRK (Humeau Laboratoire, La Chapelle sur Erdre, France) sur 3 aérateurs, à l'aide d'écouvillons NRS (AES-Chemunex, Bruz, France) sur 3 aérateurs et enfin par action des billes de verres, sur 2 aérateurs. Pour cela les aérateurs ont été placés dans des flacons préalablement rempli d'un mélange de 10 mL d'eau et de 2 g de billes. L'agitation a été assurée à l'aide d'un vortex pendant 30 s. Les bactéries ainsi collectées ont ensuite été dénombrées sur milieu CN.

### 2.4.2. Robinets

Chaque robinet a été vidé et rincé avec de l'eau distillée stérile de manière à éliminer les bactéries planctoniques. Afin de déterminer le niveau de contamination de l'eau avant le décrochage du biofilm, chaque robinet a ensuite été rempli avec de l'eau distillée stérile et les dénombrements de *P. aeruginosa* et de la flore aérobie revivifiable ont été réalisés sur cette eau. Les billes de verre borosilicaté de 1 mm de diamètre (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) ont ensuite été introduites dans chaque robinet à raison de 2 g de billes pour 10 mL d'eau. Après repositionnement de l'aérateur, l'extrémité du robinet a été recouverte de parafilm®. Chaque robinet a été introduit dans un sac plastique pour éviter les éventuelles projections de

microgouttelettes lors de l'agitation mécanique. Celle-ci a été réalisée à l'aide d'un vortex pendant 1, 2, 3 et/ou 5 min de manière à décrocher le biofilm adhérent aux parois internes des robinets.

## 2.5. Évaluation du décrochage du biofilm et choix du test statistique

Dans le cas des aérateurs, les analyses ont été réalisées sur les suspensions obtenues après décrochage du biofilm et les résultats obtenus par action mécanique des billes ont été comparés aux résultats obtenus par écouvillonnage. Dans le cas des robinets, les analyses ont été réalisées sur l'eau contenant le biofilm décroché et les résultats ont été comparés aux dénombrements réalisés avant décrochage. L'analyse des résultats a été effectuée en comparant les résultats avant et après action des billes à l'aide du test de Wilcoxon, adapté aux petits échantillons appariés.

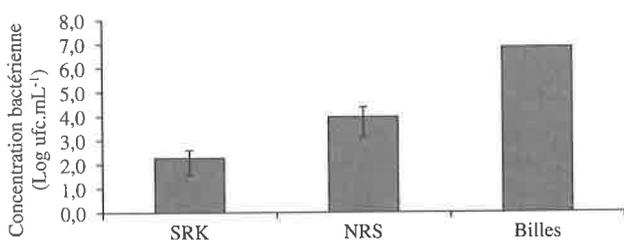
## 2.6. Quantification de *P. aeruginosa* par biologie moléculaire

L'ADN contenu dans les échantillons d'eau du robinet 5 avant et après décrochage de biofilm a été extrait à l'aide du kit Nuclisens® miniMAG™ (Biomérieux, Marcy l'Etoile, France). Les analyses PCR ont été réalisées en utilisant le kit Rotor-Gene® Multiplex ainsi que les amorces et la sonde spécifique de *P. aeruginosa* précédemment décrites (Anuj *et al.*, 2009). L'amplification a été réalisée sur RotorGene Q.

## 3. RÉSULTATS

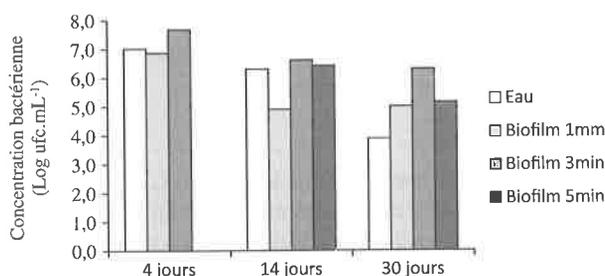
### 3.1. Les aérateurs

Dans un premier temps, l'efficacité du décrochage d'un biofilm par action mécanique de billes de verre a été comparée à l'efficacité d'un décrochage à l'aide de deux types d'écouvillons. Les résultats présentés dans la figure 1 montrent que la plus grande quantité de bactéries a été obtenue après action des billes. Les quantités de bactéries récoltées à l'aide des écouvillons semblent dépendre de la solution utilisée pour la remise en suspension. Ainsi les résultats obtenus après remise en suspension dans une solution de Ringer sont inférieurs de 2 Log aux résultats obtenus après remise en suspension dans une solution NRS™.



**Fig. 1.** Comparaison de méthodes de décrochage du biofilm sur des aérateurs.

**Fig. 1.** Comparison of swabbing and mechanical action of glass beads to collect biofilm.



**Fig. 2.** Évaluation du décrochage du biofilm présent dans un mitigeur.

**Fig. 2.** Evaluation of biofilm sampling in a tap.

### 3.2. Les robinets

Les différents modèles de robinets ont été contaminés artificiellement avec la souche de *P. aeruginosa* ATCC 10145. Le niveau de contamination de la surface interne des robinets a été suivi au cours du temps en appliquant le protocole décrit ci-dessus. Ce protocole a été appliqué sur des biofilms âgés de 4, 14 et 30 jours et l'efficacité de l'action mécanique exercée par les billes de verre a été mise en évidence en réalisant des dénombrements de *P. aeruginosa* et/ou de flore totale aérobie avant et après action des billes.

Le robinet 1 a été contaminé artificiellement avec la souche de *P. aeruginosa* ATCC 10145 et le suivi de l'implantation de la bactérie dans le biofilm a été réalisé 4, 14 et 30 jours après l'inoculation. L'efficacité du décrochage du biofilm a été dans un premier temps évaluée uniquement en mesurant la concentration en *P. aeruginosa* (fig. 2). Quatre jours après l'inoculation de la souche *P. aeruginosa* ATCC 10145 dans le robinet 1, les concentrations, mesurées dans l'eau de rinçage, sont très élevées de l'ordre de  $10^7$  ufc.mL<sup>-1</sup>, suggérant que le biofilm récemment implanté, libère facilement les bactéries. Il en est de même, 14 jours après l'inoculation. Dans les deux cas, l'action

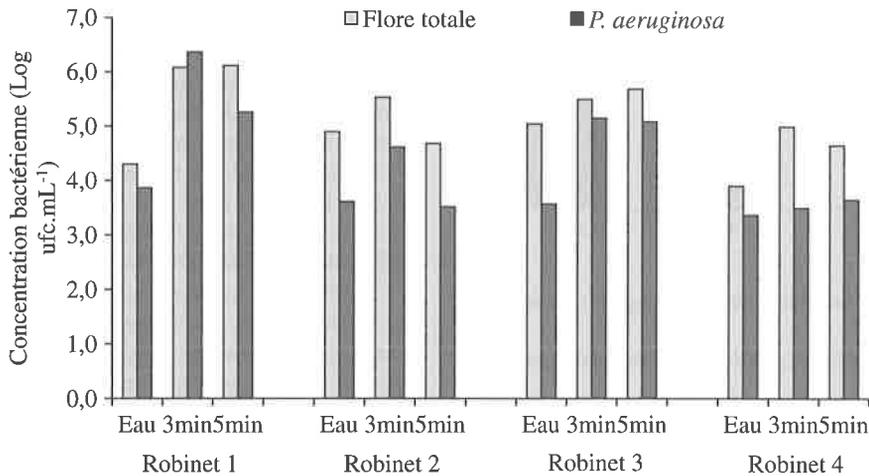
mécanique des billes permet d'obtenir un dénombrement de bactéries légèrement plus élevé, mais non significatif. Trente jours après l'inoculation, le simple rinçage à l'eau distillée permet de dénombrer  $7,7 \times 10^3$  ufc.mL<sup>-1</sup>, tandis que l'action mécanique des billes appliquée pendant 3 ou 5 minutes permet de mettre en évidence environ 100 fois plus de bactéries dans le robinet. Dans les trois conditions, l'action mécanique des billes pendant 1 minute n'est pas suffisante pour décrocher les bactéries des parois du robinet.

L'efficacité du décrochage du biofilm a été évaluée sur des biofilms âgés de 30 jours établis dans les robinets 1, 2, 3 et 4, en mesurant la concentration en flore aérobie revivable et en *P. aeruginosa*. Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 3. Pour le robinet 1, l'efficacité des décrochages réalisés pendant 3 et 5 minutes est équivalente si l'on tient compte de la flore aérobie revivable. La concentration en flore totale de l'échantillon de biofilm est de  $1,3 \times 10^6$  ufc.mL<sup>-1</sup>, ce qui correspond à une concentration 60 fois plus élevée que celle mesurée dans l'eau avant l'action des billes. Pour le robinet 2, le décrochage réalisé pendant 3 minutes permet de libérer un plus grand nombre de bactéries. La concentration en flore totale de l'échantillon de biofilm est de  $3,4 \times 10^5$  ufc.mL<sup>-1</sup>, ce qui correspond à une concentration 4,3 fois plus élevée que celle mesurée dans l'eau avant l'action des billes. La concentration en *P. aeruginosa*, est de  $4,1 \times 10^4$  ufc.mL<sup>-1</sup> dans le biofilm, soit 10 fois plus que dans l'eau. Pour le robinet 3, l'efficacité des décrochages réalisés pendant 3 et 5 minutes est équivalente. La concentration en flore totale est de  $4,80 \times 10^5$  ufc.mL<sup>-1</sup> dans le biofilm, soit 4,4 fois plus élevée que dans l'eau. La concentration en *P. aeruginosa*, est de  $1,4 \times 10^5$  ufc.mL<sup>-1</sup> dans le biofilm soit 38 fois plus élevée que dans l'eau.

Pour le robinet 4, le décrochage réalisé pendant 3 minutes permet de libérer un plus grand nombre de bactéries. La concentration en flore totale est de  $9,7 \times 10^4$  ufc.mL<sup>-1</sup> dans le biofilm soit 12 fois plus élevée que dans l'eau. La concentration en *P. aeruginosa* est de  $3,1 \times 10^3$  ufc.mL<sup>-1</sup> dans le biofilm soit 1,4 fois plus élevée que dans l'eau.

Le test de Wilcoxon adapté aux petits échantillons appariés permet d'établir que les dénombrements réalisés après action mécanique des billes sont significativement plus importants que les dénombrements initiaux. Le décrochage réalisé pendant 3 minutes semble le plus approprié pour récupérer un biofilm.

Le robinet 5, a été utilisé pour tester le protocole sur un biofilm naturel. Il s'agit d'un robinet mélangeur en col de cygne dont les parois internes sont lisses. Le robinet a été rempli à l'aide de 50 mL d'eau distillée et les dénombrements réalisés sur cette eau de rinçage ont permis de mettre en évidence une concentration en flore totale de  $5 \times 10^3$  ufc.mL<sup>-1</sup> dans l'eau. Après décrochage, la concentration en flore totale est de  $1,8 \times 10^5$  ufc.mL<sup>-1</sup> et la présence de *P. aeruginosa* a été mise en évidence.



**Fig. 3.** Dénombrement de la flore totale et de *P. aeruginosa* dans un biofilm artificiel implanté depuis 30 jours dans 4 robinets.  
**Fig. 3.** Enumeration of heterotrophic plate count and *P. aeruginosa* in 30 days-old biofilms established in 4 taps.

La présence de *P. aeruginosa* a été confirmée par PCR dans l'échantillon d'eau et de biofilm du robinet 5 à un niveau de concentration de  $2 \times 10^3$  ug.mL<sup>-1</sup>.

#### 4. DISCUSSION

*P. aeruginosa* est un germe pathogène, que l'on cherche à éradiquer dans différents types de réseaux de distribution d'eau à l'intérieur des bâtiments. Cette bactérie représente, en effet, le troisième agent infectieux impliqué dans des infections nosocomiales (INVS, 2009) et plusieurs auteurs mettent en avant le rôle de l'environnement hydrique comme réservoir et vecteur de cette bactérie au sein des établissements hospitaliers et plus particulièrement dans les services de réanimation (Blanc *et al.*, 2007 ; Cuttelod *et al.*, 2010 ; Lashéras *et al.*, 2006 ; Leroyer, 2011 ; Rogues *et al.*, 2007 ; Vallés *et al.*, 2004 ; van der Mee-Marquet *et al.* 2005). Pour autant de nombreuses questions se posent concernant la localisation de la bactérie au sein du réseau, la dynamique d'implantation de la bactérie dans le biofilm et sur sa persistance au point d'usage malgré l'application de procédure de nettoyage et désinfection. Dans cette zone particulière du réseau, les conditions différentes de celles présentes dans les canalisations, du fait notamment de la nature et de la rugosité des matériaux, de la température et de la stagnation de l'eau, peuvent induire la prolifération de certaines espèces indésirables. La majorité des études d'occurrence de *P. aeruginosa* est faite dans les réseaux de distribution d'eau à l'intérieur du bâtiment, la bactérie est recherchée dans l'eau au point d'usage, mais ces prélèvements ne donnent que des informations très partielles sur la

localisation de la bactérie dans le réseau. L'objectif de ce travail était de mettre au point un protocole permettant de décrocher le biofilm présent à l'intérieur des robinets afin de mieux appréhender et caractériser les populations de *P. aeruginosa* présentes au sein des biofilms de la robinetterie sanitaire et pour pouvoir ensuite comparer l'occurrence de la bactérie dans les biofilms des points d'usage et dans les biofilms des canalisations.

Le décrochage du biofilm qui se développe sur les matériaux en contact avec l'eau peut être réalisé de différentes façons en fonction du type de support choisis et de l'objectif visé. Ces méthodes peuvent être regroupées en quatre grandes catégories. On distingue ainsi les méthodes par grattage, basées sur l'utilisation d'écouvillons, de brosses ou de spatules (Moritz *et al.*, 2010, Wirtanen *et al.*, 2001) l'utilisation de bain à ultrasons (Farhat *et al.*, 2011), les méthodes basées sur l'utilisation de sonosonde (Mathieu *et al.*, 2009) ou les méthodes utilisant l'action mécanique de billes de verre (Lehtola *et al.*, 2004, 2006, 2007). Dans le cas de la robinetterie sanitaire, l'utilisation des écouvillons paraît intéressante pour évaluer la présence d'un germe sur des zones démontables et accessibles tels que les aérateurs ou mousseurs mais leur utilisation n'est pas adaptée à la quantification des bactéries présentes sur la surface interne des robinets, souvent inaccessible. L'utilisation de la sonication à forte comme à faible énergie n'est également pas envisageable. En revanche l'utilisation de billes de verre et leur action mécanique sur les surfaces internes nous est apparue être une alternative intéressante.

Partant des observations de Accrombessi et Moulin (2010) qui montrent que la méthode de décrochage manuelle à l'aide d'écouvillon peut être utilisée comme

méthode de référence pour évaluer l'efficacité des méthodes de décrochage du biofilm et optimiser les protocoles de sonication, nous avons comparé la méthode de décrochage par agitation mécanique à la méthode utilisant des écouvillons sur des aérateurs recouverts d'un biofilm de *P. aeruginosa* obtenu dans les mêmes conditions. Les résultats montrent que la méthode utilisant des billes de verre, assure un meilleur décrochage du biofilm artificiel sur des surfaces relativement planes. Cette méthode a ensuite été adaptée et optimisée pour décrocher le biofilm à l'intérieur de différents robinets. Le protocole retenu pour décrocher le biofilm présent à l'intérieur des éléments de robinetterie sanitaire consiste à remplir le robinet, préalablement démonté du point d'usage, d'un mélange constitué d'eau stérile et de billes de verre borosilicaté (10:2) et à le soumettre à une agitation mécanique pendant 3 min. La composition microbiologique du biofilm ainsi décroché peut ensuite être étudiée. Ce protocole permet de remettre en suspension une fraction de la population adhérente et la concentration en micro-organismes mesurés est alors supérieure (jusqu'à 2 Log) à la concentration mesurée dans le prélèvement d'eau correspondant au premier jet.

## 5. CONCLUSION

La maîtrise de la qualité de l'eau au point d'usage dépend de plusieurs facteurs et notamment (i) de la configuration du point d'usage (antenne terminale, robinetterie, bonde et siphon) permettant de limiter les développements bactériens et les phénomènes de rétrocontamination et (ii) des procédures de nettoyage et désinfections appliquées localement. Afin de pouvoir étudier l'impact de ces différents paramètres sur la flore présente dans le biofilm de la robinetterie, de réaliser des suivis de l'implantation de *P. aeruginosa* dans le biofilm et d'évaluer l'efficacité de procédures de nettoyage et désinfection, nous avons mis au point un protocole de décrochage du biofilm présent à l'intérieur de la robinetterie sanitaire. Ce protocole pourra être utilisé pour étudier l'implantation de *P. aeruginosa* dans les réseaux intérieurs et évaluer l'impact des traitements de désinfection au niveau de la robinetterie sanitaire.

## RÉFÉRENCES

- Accrombessi H., Moulin L., 2010. Comparaison des méthodes de décrochement du biofilm lors de tests sur les matériaux organiques. *Eur. J. Water Qual.*, 41, 123–129.
- ANSES, 2010. Évaluation des risques sanitaires liés à l'exposition par ingestion de Pseudomonades dans les eaux destinées à la consommation humaine (hors eaux conditionnées).
- Anuj S.N., Whiley D.M., Kidd T.J., Bell S.C., Wainwright C.E., Nissen M.D., *et al.* 2009. Identification of *Pseudomonas aeruginosa* by a duplex real-time polymerase chain reaction assay targeting the *ecfX* and the *gyrB* genes. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 63(2), 127–131.
- Blanc D.S., 2004. The use of molecular typing for epidemiological surveillance and investigation of endemic nosocomial infections. *Infect. Genet. Evol.*, 4(3), 193–197.
- Blanc D., Nahimana I., Petignat C., Wenger A., Bille J., Francioli P., 2004. Faucets as a reservoir of endemic *Pseudomonas aeruginosa* colonization/infections in intensive care units. *Intensive Care Med.*, 30(10), 1964–1968.
- Blanc D.S., Francioli P., Zanetti G., 2007. Molecular Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* in the Intensive Care Units – A Review. *Open Microbiol. J.*, 1, 8–11.
- Cuttelod M., Senn L., Terletskiy V., Nahimana I., Petignat C., Eggimann P., *et al.*, 2010. Molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care units over a 10-year period (1988–2007). *Clinical Microbiology and Infection*, 17(1), 57–62.
- Farhat M., Trouilhé M., Forêt C., Hater W., Moletta-Denat M., Robine E., *et al.* 2011. Chemical disinfection of *Legionella* in hot water systems biofilm: a pilot-scale 1 study. *Water Sci. Technol.*, 64(3), 708–714.
- INVS, 2009. Enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales, France, juin 2006, Paris : Institut de veille sanitaire.
- Lashéras A., Guisset O., Boulestreau H., Rogues A.M., Fiore M., Szajner S., *et al.*, 2006. Réservoirs et transmission de *Pseudomonas aeruginosa* en réanimation médicale. *Med. Mal. Infect.*, 36(2), 99–104.
- Lehtola M.J., Miettinen I.T., Keinänen M.M., Kekki T.K., Laine O., Hirvonen A., *et al.*, 2004. Microbiology, chemistry and biofilm development in a pilot drinking water distribution system with copper and plastic pipes. *Water Res.*, 38(17), 3769–3779.
- Lehtola M.J., Laxander M., Miettinen I.T., Hirvonen A., Vartiainen T., Martikainen P.J., 2006. The effects of changing water flow velocity on the formation of biofilms and water quality in pilot distribution system consisting of copper or polyethylene pipes. *Water Res.*, 40(11), 2151–2160.
- Lehtola M.J., Miettinen I.T., Hirvonen A., Vartiainen T., Martikainen P.J., 2007. Estimates of microbial quality and concentration of copper in distributed drinking water are highly dependent on sampling strategy. *Int. J. Hyg. Environ. Health.*, 210(6), 725–732.
- Leroyer C., 2011. Acquisition de *Pseudomonas aeruginosa* en service de réanimation : à propos d'une étude prospective multicentrique Thèse-Université de Bordeaux 2-Victor Segalen 2011.
- Mathieu L., Bouteleux C., Fass S., Angel E., Block J.C., 2009. Reversible shift in the [alpha]-, [beta]- and [gamma]-proteobacteria populations of drinking water biofilms during discontinuous chlorination. *Water Res.*, 43(14), 3375–3386.

- Moritz M.M., Flemming H.C., Wingender J., 2010. Integration of *Pseudomonas aeruginosa* and *Legionella pneumophila* in drinking water biofilms grown on domestic plumbing materials. *Int. J. Hyg. Environ. Health.*, 2010 May 31.
- Petignat C.M.D., Francioli P.M.D., Nahimana I.M.D., Wenger A.M., Bille J.M.D., Schaller M.D.M.D., *et al.*, 2006. Exogenous Sources of *Pseudomonas aeruginosa* in Intensive Care Unit Patients : Implementation of Infection Control Measures and Follow-Up With Molecular Typing. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.*, 27(9), 953–957.
- Rogues A.M, Boulestreau H., Lashéras A., Boyer A., Gruson D., Merle C., *et al.*, 2007. Contribution of tap water to patient colonisation with *Pseudomonas aeruginosa* in a medical intensive care unit. *J. Hosp. Infect.* 2007 Sep, 67(1), 72–78.
- Vallés J., Mariscal D., Cortés P., Coll P., Villagrà A., Díaz E., *et al.*, 2004. Patterns of colonization by *Pseudomonas aeruginosa* in intubated patients: a 3-year prospective study of 1,607 isolates using pulsed-field gel electrophoresis with implications for prevention of ventilator-associated pneumonia. *Intensive Care Med.*, 30(9), 1768–1775.
- van der Mee-Marquet N., Bloc D., Briand L., Besnier J.M., Quentin R., 2005. Non-touch fittings in hospitals: a procedure to eradicate *Pseudomonas aeruginosa* contamination. *J. Hosp. Infect.*, 60, 235–239.
- Wirtanen G., Salo S., Helander I.M., Mattila-Sandholm T., 2001. Microbiological methods for testing disinfectant efficiency on *Pseudomonas* biofilm. *Colloids Surf. B Biointerfaces*, 20(1), 37–50.