

Titre: Impact des différents types de robinets sur l'occurrence de *pseudomonas aeruginosa* dans l'eau des grands bâtiments
Title: Impact des différents types de robinets sur l'occurrence de *pseudomonas aeruginosa* dans l'eau des grands bâtiments

Auteur: Dominique Charron
Author:

Date: 2014

Type: Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

Référence: Charron, D. (2014). Impact des différents types de robinets sur l'occurrence de *pseudomonas aeruginosa* dans l'eau des grands bâtiments [Mémoire de maîtrise, École Polytechnique de Montréal]. PolyPublie.
Citation: <https://publications.polymtl.ca/1536/>

Document en libre accès dans PolyPublie

Open Access document in PolyPublie

URL de PolyPublie: <https://publications.polymtl.ca/1536/>
PolyPublie URL:

Directeurs de recherche: Michèle Prévost
Advisors:

Programme: Génie civil
Program:

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

IMPACT DES DIFFÉRENTS TYPES DE ROBINETS SUR
L'OCCURRENCE DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* DANS L'EAU
DES GRANDS BÂTIMENTS

DOMINIQUE CHARRON

DÉPARTEMENT DES GÉNIES CIVIL, GÉOLOGIQUE ET DES MINES
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLÔME DE MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES
(GÉNIE CIVIL)

AOÛT 2014

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Ce mémoire intitulé :

IMPACT DES DIFFÉRENTS TYPES DE ROBINETS SUR L'OCCURRENCE DE
PSEUDOMONAS AERUGINOSA DANS L'EAU DES GRANDS BÂTIMENTS

présenté par : CHARRON Dominique

en vue de l'obtention du diplôme de : Maîtrise ès sciences appliquées

a été dûment accepté par le jury d'examen constitué de :

M. BARBEAU Benoit, Ph.D., président

Mme PRÉVOST Michèle, Ph.D., membre et directrice de recherche

Mme LEFEBVRE Marie-Claude, MOAQ, MBA, membre

DÉDICACE

*À ma famille, mon amoureux et mes deux cocottes.
L'apprentissage des objectifs réalistes.*

REMERCIEMENTS

Je souhaiterais, tout d'abord, remercier ma directrice, Michèle Prévost, pour son enthousiasme face au projet, sa rigueur et son expertise. C'est également grâce à elle que j'ai accepté et mené à terme un projet de recherche et que j'ai intégré une équipe si dynamique que constitue la Chaire Industrielle CRSNG en Eau Potable.

J'aimerais faire un remerciement tout spécial à ma très généreuse collègue Émilie Bédard. Elle s'est impliquée dans mon projet, du stade embryonnaire jusqu'à la toute fin. Elle y a mis un temps incalculable et probablement démesuré, du fait qu'elle a participé à la plupart de mes réunions et répondu à mes nombreuses questions. Aussi, ses encouragements ont été plus que précieux.

J'aimerais également remercier mes collègues Cindy Lalancette et Stéphanie Fey pour leur soutien, leur aide et leur écoute. Elles ont su agrémenter joyeusement et agréablement mes journées de maîtrise passée au laboratoire et au bureau.

Je tiens également à remercier et souligner le travail formidable du personnel de la Chaire. Entre autres, merci à Yves qui m'a accompagné lors de mon échantillonnage et m'a aidé à concrétiser mes essais sur les tressés flexibles. De plus, merci à Jacinthe et Mélanie, qui m'ont aidée à découvrir le monde de la microbiologie, le concept de stérilité et qui m'ont fait aimer les filtrations et la préparation de milieux de culture. Je ne peux passer sous silence qu'elles m'ont transmis leur passion; j'ai adoré travailler au laboratoire.

Je remercie également l'ensemble du personnel de la Chaire, l'accueil était des plus chaleureux, les dîners au combien divertissants et les journées de présentation si enrichissantes.

J'aimerais également remercier mon amoureux, sans qui la réussite de mes objectifs n'aurait été possible. Merci d'avoir pris en charge notre progéniture à maintes reprises lorsque je devais travailler tard le soir; lors des réunions, des analyses de laboratoire et lors de ma rédaction d'article et de mémoire. Également, ta compréhension et tes encouragements ont été précieux, toi qui est passé par là il y a quelques années! Finalement, c'est grâce à toi que j'ai appris à me fixer des objectifs réalistes puisque tout prend le double du temps.

RÉSUMÉ

Cette étude a pour but de déterminer si les robinets électroniques sont davantage ou moins colonisés que les robinets conventionnels, d'évaluer si les conduites de raccordement ou certains paramètres physico-chimiques peuvent influencer la contamination au robinet, déterminer la zone de prolifération dans les réseaux d'eau froide et de comparer deux méthodes de quantification de *P. aeruginosa*, soit une par culture (ISO 16266) et une par mesure d'activité enzymatique (Pseudalert, IDEXX™).

Plus de 200 robinets ont été caractérisés et échantillonnés pour évaluer la prévalence de *P. aeruginosa* dans 4 hôpitaux entre mars et juillet 2013. La répartition entre les types de robinets était la suivante : 105 robinets électroniques, 90 conventionnels et 14 à pédales. Parmi ces robinets, un grand nombre était localisé dans les secteurs où les patients sont le plus à risque de contracter des infections, notamment, les unités de soins intensifs, blocs opératoires, hémato-oncologie et greffés. Pour chacun des robinets, un litre d'eau froide était collecté au 1^{er} jet et analysé par culture selon le protocole ISO 16266 et par détection enzymatique avec le Pseudalert (IDEXX™). Des frottis des drains et des aérateurs étaient également prélevés et mis en culture. Toutes les caractéristiques du robinet, du drain et de la tuyauterie ont été notées. Également, les paramètres physico-chimiques suivants ont été mesurés : le cuivre, le chlore résiduel, le débit et la température de l'eau chaude après 1 minute. Enfin, un échantillonnage séquentiel de petits volumes d'eau a été effectué sur les robinets dont l'eau était positive pour *P. aeruginosa* afin de déterminer la provenance de la contamination et un test sur de la tuyauterie a été réalisé au laboratoire.

Les résultats ont démontré, en accord avec la littérature, un important taux de contamination des drains par *P. aeruginosa* (51 %), tandis que les aérateurs et l'eau étaient très souvent négatifs (aérateurs : 1 %, culture : 4 %, Pseudalert : 16 %). Les résultats de prévalence de *P. aeruginosa* étaient comparables entre les robinets électroniques (15 %) et les robinets conventionnels (12 %), tandis qu'elle était légèrement plus élevée (29 %) pour les robinets à pédales. En différenciant les types de robinets électroniques, ceux ayant un dispositif à la base du robinet et permettant un ajustement manuel de la température étaient moins contaminés (15 %) que ceux ayant un contrôle séparé du robinet (31 %).

L'analyse statistique des résultats par régression adaptative multivariée (MARSpline) a montré qu'il est nécessaire de considérer l'ensemble des paramètres pour dégager les variables les plus importantes pour la prévision de la prévalence ou des concentrations de *P. aeruginosa* dans l'eau. Selon le type de méthode de détection, les prédicteurs significatifs incluent la positivité de l'aérateur, la présence de conduites de cuivre ou la concentration de cuivre dans l'eau, la température et le type de robinet. Aussi, pour ce qui est de la comparaison des méthodes de détection, les réponses obtenues concordent, malgré des résultats légèrement plus élevés avec la détection enzymatique. Les résultats de l'échantillonnage séquentiel ont confirmé une contamination plus importante au robinet et dans la conduite de raccordement. Enfin, les essais au laboratoire effectués sur des tressés flexibles et des tuyaux de cuivre ont montré que les tressés flexibles étaient plus susceptibles à la contamination que le cuivre à la contamination.

Cette étude permet de conclure que nos résultats de prévalence sont cohérents avec ceux disponibles dans la littérature. Les robinets électroniques ayant un ajustement manuel au bas du robinet, sans volume de stagnation significatif, ne sont pas plus contaminés que les robinets conventionnels, mais les robinets électroniques avec un contrôle de température séparé du robinet le sont davantage. Certains types de robinets électroniques seraient donc plus susceptibles à la contamination que d'autres. Également, la majorité des robinets électroniques étant raccordés par des conduites en tressé flexible qui les rendent plus susceptibles à la contamination par *P. aeruginosa*. Finalement l'étude montre aussi que la méthode de détection enzymatique est plus sensible que la méthode de culture.

ABSTRACT

This study aims to clarify whether electronic faucets are more or less colonized than conventional faucets, to assess whether the connecting pipes or some physicochemical parameters can influence contamination at the tap, determine the area of proliferation within the cold distribution system and compare two methods for quantification of *P. aeruginosa*, culture (ISO 16266) and enzyme detection (Pseudalert IDEXX™).

More than 200 taps have been characterized and sampled to assess the prevalence of *P. aeruginosa* in four hospitals between March and July 2013. The breakdown between types of taps was: 105 electronic faucets, 90 manual and 14 foot operated faucet. Among these faucets, many were located in areas where patients are most at risk of contracting infections, including the intensive care units, operating rooms, haemato-oncology and transplant. For each faucet, a liter from first flush of cold water was collected and analyzed by culture according to the ISO 16266 protocol and enzymatic detection method with Pseudalert (IDEXX™). Also, swabs of drains and aerators were cultured. All characteristics of taps, drains and connecting pipes were recorded. The following physico-chemical parameters were measured: copper, residual chlorine, flow rate and temperature of hot water after 1 minute. Moreover, a sequential sampling of small volumes of water was performed on water taps that were positive for *P. aeruginosa* to determine the source of contamination. Finally, a laboratory test was conducted on connecting pipes.

Results have shown, in agreement with the literature, a high rate of contamination of drains by *P. aeruginosa* (51%), while the aerators and water were frequently negative (aerators: 1%, culture: 4 % Pseudalert: 16%). Results of prevalence of *P. aeruginosa* were comparable between electronic faucets (15%), manual faucets (12%), while it was slightly higher (29%) for foot operated faucets. By differentiating types of electronic faucet, those permitting manual adjustment of temperature with a lever at the base of the faucet were less contaminated (15%) than those with a separate control of temperature (31%). Multivariate adaptive regression (MARSpline) showed that it is necessary to consider all the parameters to identify the most important variables in predicting the prevalence or concentrations of *P. aeruginosa* in the water. Depending on the detection method, the significant predictors include the positivity of the aerator, the presence of copper tubing or copper levels in water, the temperature and the type of valve. Also, with regard to the comparison of the detection methods, the responses are coherent, although with slightly

higher results with enzymatic detection. The results of the sequential sampling confirmed greater contamination in the faucet and its connecting piping. Finally, laboratory tests carried out on flexible braided copper pipes showed that flexible braided piping were more susceptible to contamination as copper contamination.

This study concluded that prevalence results obtained are coherent with results available in the literature. Also, electronic faucets with manual adjustment incorporated in the body of the tap, without significant volume of stagnation, were not more contaminated than manual faucets, but that electronic faucets with separate temperature control were more susceptible to contamination. Some types of electronic faucets would therefore be more prone to contamination than others. Also, the majority of electronic faucets are connected with flexible hoses which make them more susceptible to contamination to *P. aeruginosa*. The study also showed that the enzymatic detection method is more sensitive than the culture method.

TABLE DES MATIÈRES

DÉDICACE.....	III
REMERCIEMENTS	IV
RÉSUMÉ.....	V
ABSTRACT	VII
LISTE DES TABLEAUX.....	XII
LISTE DES FIGURES	XIII
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	XIV
LISTE DES ANNEXES	XVI
INTRODUCTION.....	1
MISE EN CONTEXTE.....	1
OBJECTIFS	3
PLAN DU MÉMOIRE.....	3
CHAPITRE 1 REVUE DE LITTÉRATURE	5
1.1 Grandes orientations de conception et d'exploitation des systèmes d'eau potable dans les grands bâtiments	5
1.1.1 Mise en contexte sur les robinets électroniques	6
1.1.2 Plomberie de raccordement.....	10
1.1.3 Normes d'eau potable applicables aux éléments de plomberie.....	11
1.2 Grandes orientations pour protéger la santé des usagers des systèmes d'eau potable dans les établissements de santé.....	12
1.2.1 Mise en contexte sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	14
1.2.2 Normes microbiologiques de qualité d'eau.....	15
1.3 Les infections nosocomiales par <i>P. aeruginosa</i> reliées à la contamination de l'eau potable ou du système de distribution	16

1.3.1 Résultats de prévalence de <i>P. aeruginosa</i> dans le biofilm	17
1.3.2 Résultats de prévalence de <i>P. aeruginosa</i> dans l'eau.....	18
1.3.3 Résultats de prévalence de <i>P. aeruginosa</i> selon les types de robinets	20
1.3.4 Contamination des conduites de raccordement de plomberie en tressé flexible.....	23
CHAPITRE 2 DÉMARCHE DE L'ENSEMBLE DU TRAVAIL DE RECHERCHE.....	24
2.1 Contamination par <i>P. aeruginosa</i> selon les types de robinet et suivi des paramètres physico-chimiques de l'eau	24
2.1.1 Caractérisation dans les établissements de santé.....	24
2.1.2 Campagne d'échantillonnage	24
2.2 Déterminer la zone de prolifération de <i>P. aeruginosa</i> dans les réseaux d'eau froide....	25
2.3 Évaluer si les conduites de raccordement sont propices à la contamination par <i>P. aeruginosa</i>	25
2.4 Comparaison de deux méthodes de quantification de <i>P. aeruginosa</i>	26
2.4.1 Essais au laboratoire.....	26
2.4.2 Campagne d'échantillonnage	26
CHAPITRE 3 ARTICLE 1: IMPACT OF ELECTRONIC FAUCETS AND WATER QUALITY ON THE OCCURRENCE OF <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i>: A MULTI-HOSPITAL STUDY	27
Abstract	27
3.1 Introduction	28
3.2 Material and methods	30
3.3 Results	31
3.4 Discussion	36
CHAPITRE 4 ASPECTS MÉTHODOLOGIQUES ET RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES À L'ARTICLE	42

4.1	Contamination selon les marques de robinet.....	42
4.2	Niveaux de contamination de <i>P. aeruginosa</i>	43
4.2.1	Dans l'eau.....	43
4.2.1	Dans le biofilm	44
4.3	Concentration de <i>P. aeruginosa</i> dans l'eau au premier jet et dans le système	45
4.4	Comparaison entre les deux méthodes de quantification de <i>P. aeruginosa</i>	46
4.4.1	Différence de prévalence et de concentration entre les deux méthodes.....	47
4.4.2	Influence du chlore et du cuivre sur les deux méthodes	48
	CHAPITRE 5 DISCUSSION	51
5.1	Disparités dans les méthodes d'échantillonnage.....	51
5.2	Coût des deux méthodes de quantification de <i>P. aeruginosa</i>	52
5.3	Compromis entre les préoccupations environnementales et économiques et les préoccupations pour préserver la santé des usagers	54
5.4	Limites de l'étude.....	56
	CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS	59
	RÉFÉRENCES	63
	ANNEXES	72

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1 Prévalences (%) de <i>P. aeruginosa</i> observées dans l’écouvillonnage de biofilm des drains, des robinets et des aérateurs	19
Tableau 1.2 Résultats de prévalence (%) de <i>P. aeruginosa</i> dans l’eau aux robinets (études de plus de 25 robinets)	20
Tableau 1.3 Résultats de prévalences (%) de <i>P. aeruginosa</i> selon les types de robinets	21
Tableau 3.1 Percentage (%) of positive samples for <i>P. aeruginosa</i> in biofilm swabs of drains and aerators by culture and in 100mL of water samples by culture and enzyme detection (* p<0.01)	31
Tableau 3.2 Summary statistics per type of faucet, connecting water pipes and physico-chemical parameters for positive <i>P. aeruginosa</i> samples, where <i>nTOT</i> represents the total number of samples, <i>n⁺</i> the number of positive samples and <i>nTOT</i> + the total number of positive samples for a given category	32
Tableau 3.3 Multivariate adaptative regression (MARSpline) results presenting significant variables for all faucets (4 types) and specifically for efaucets for either culture and/or enzyme detection as response variables	33
Tableau 4.1 Contamination selon les marques des robinets et selon les types de robinets.....	43
Tableau 4.2 Concentrations de <i>P. aeruginosa</i> dans l’eau rapportées et observées durant cette étude	44
Tableau 5.1 Comparatif entre la culture et la détection enzymatique	53
Tableau 5.2 Compromis face à la gestion de l’eau et aux choix de dispositifs dans les établissements de santé.....	56

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 Contrôle de la température dans différents types de robinets électroniques (Halabi et al., 2001; Merrer et al., 2005; SLOAN, 2010)	9
Figure 3.1 Mean <i>P. aeruginosa</i> (MPN/mL) by enzymatic detection in water (a) and by culture for swab samples (b), in flexible hoses (ELAST #1 and ELAST #2) and in copper pipe sections incubated at different temperatures for 24h to 6 days. Initial inoculum value of approximately 10^5 MPN/mL indicated by red line. Swab sample results are expressed as relative abundance (L0=0 CFU/swab, L1=1-10 CFU/swab; L2=10-100 CFU/swab and L3=>100 CFU/swab). All values at 55°C were below detection level (BDL).	34
Figure 3.2 Mean copper (n=160) and residual chlorine (n=134) concentration for all sampling and for <i>P. aeruginosa</i> negative and positive sampleswith culture and enzymatic detection method.....	35
Figure 3.3 a) Presence of <i>P. aeruginosa</i> in water volumes taken in sequence (at three faucets) analyzed by culture (n=2) and by enzymatic detection (n=4); b) copper ($\mu\text{g/L Cu}$) in water samples from sequential volumes and free chlorine concentrations (mg Cl ₂ /L) measured for each sampling event	36
Figure 4.1 Niveaux de <i>P. aeruginosa</i> dans le biofilm, selon les types de robinet et types de raccordement de plomberie (Walker et al., 2014).....	45
Figure 4.2 Moyenne \pm écart-type des concentrations de <i>P. aeruginosa</i> dans l'eau du premier jet et après rinçage (système) observés pendant l'étude de Cristina et al. (2014) et cette étude.	46
Figure 4.3 Concentrations moyenne (\pm écart-type) de <i>P. aeruginosa</i> dans les échantillons positifs mesurés par culture et par détection enzymatique (nombre de positifs : n=34 par méthode enzymatique et n=9 par culture).....	47
Figure 4.4 Concentrations de <i>P. aeruginosa</i> en fonction de la concentration de chlore résiduel dans le deuxième litre d'eau froide	49
Figure 4.5 Concentrations de <i>P. aeruginosa</i> en fonction de la concentration de cuivre mesurée au premier jet	50

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

APIC	Association for Professionals in Infection Control and Epidemiology
ASHE	American Society for Healthcare Engineering
BNQ	Bureau de normalisation du Québec
BSI	British Standard Institution
CDC	Centers for disease control
CSA	Canadian Standard Association
DH	Department of health (Great Britain)
ECDC	European Centre of disease prevention and control
EPDM	Éthylène propylène diène monomère
EWGLI	European working group for Legionella infections
FGI	Facility Guidelines Institute
INSPQ	Institut national de santé publique du Québec
ISO	Organisation internationale de normalisation
L / minute	Litres / minute

L. pneumophila Legionella pneumophila

LEED	Leadership in Energy and Environmental design
Nb. +	Nombre positif
Nb. total	Nombre total
N.D.	Non Disponible
NSF/ ANSI	National Sanitation Foundation / American National Standards Institute
MDDEP	Ministère du Développement Durable de l'Environnement et des Parcs
MPN	Most probable number

mL millilitre

P. aeruginosa *Pseudomonas aeruginosa*

PCR Polymerase chain reaction

PER Polyéthylène réticulé (ou PEX)

PVC Polychlorure de vinyle

RBQ Régie du bâtiment du Québec

RC Robinets conventionnels

RE Robinets électroniques

RE(wTaside) Robinets électroniques avec contrôle de température séparé du robinet

SHEA Society for Healthcare Epidemiology of America

T° Température (en degré Celsius)

UFC Unité formatrice de colonie

VBNC Viables, mais non cultivables

LISTE DES ANNEXES

ANNEXE 1 Article: Recovery of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> culturability following copper – and chlorine – induced stress	72
ANNEXE 2 Résultats microbiologiques de la campagne d'échantillonnage	82
ANNEXE 3 Catalogue des principaux robinets échantillonnés.....	89

INTRODUCTION

MISE EN CONTEXTE

La présence de microorganismes opportunistes dans les systèmes de distribution d'eau potable des grands bâtiments est une situation préoccupante, spécialement dans le cas d'établissements desservant des patients vulnérables. Bien que les conditions environnementales ne soient pas idéales dans la tuyauterie et la robinetterie, certaines bactéries peuvent y proliférer en raison de leurs capacités étonnantes d'adaptation, de survie et de facilité à former du biofilm (Kerr & Snelling, 2009). Cette capacité de coloniser les réseaux de distribution est préoccupante, car des études récentes ont conclu qu'entre 30 % et 50 % des infections nosocomiales au *Pseudomonas aeruginosa*, seraient reliées à l'eau dans les soins intensifs (Exner, 2012).

Les robinets conventionnels sont de plus en plus remplacés par des robinets électroniques dans les endroits publics comme les hôpitaux. Le but étant principalement de réaliser des économies d'eau potable, de coût et d'énergie, mais également de limiter la propagation des bactéries chez les patients en minimisant le contact des mains du personnel soignant avec le robinet. Ces appareils, munis de détecteur de mouvement, sont dispendieux et ne fonctionnent pas toujours aussi bien qu'espéré. Par exemple, un temps trop long de démarrage ne laisse d'autre choix que d'agiter frénétiquement les mains devant le détecteur de présence ce qui peut engendrer des contacts avec le robinet.

Plusieurs études de cas menées dans de nombreux pays ont récemment démontré que les robinets électroniques sont plus susceptibles à la colonisation par *P. aeruginosa* que les robinets conventionnels et que cette colonisation peut entraîner des éclosions. Une seule étude mentionne qu'elle n'a pas détecté une présence accrue de *P. aeruginosa* dans l'eau de ses robinets électroniques (Assadian et al., 2002). Plusieurs facteurs ont été identifiés comme responsables probables de la contamination au robinet, notamment le faible débit d'eau, les volumes stagnants, la faible température maintenue dans le robinet et les matériaux présents dans la tuyauterie et le robinet (Halabi et al., 2001). Outre des hypothèses, peu d'études ont confirmé les causes exactes de contamination et on ne sait pas précisément pourquoi certains types de robinets (conventionnels ou électroniques) sont davantage contaminés que d'autres.

Des alternatives permettant de détecter rapidement et efficacement *P. aeruginosa* seraient également nécessaire, dans l'optique de pouvoir compléter des analyses bactériologiques de suivi

plus fréquemment dans les établissements de santé. La culture sur gélose est un méthode fastidieuse, qui prend un temps non négligeable et qui permet de recueillir seulement les bactéries cultivables et non pas la totalité des bactéries viables (Asghari et al., 2013).

Comme l'utilisation des robinets électroniques est fréquente en milieu hospitalier au Québec et suite au rapport publié par le Comité sur les infections nosocomiales du Québec présentant les risques associés à l'utilisation de ce type de robinet (Institut national de santé publique du Québec (INSPQ) & Gouvernement du Québec, 2009), il apparaissait donc important de vérifier la prévalence de *P. aeruginosa* dans les établissements de santé dans le but de vérifier si certains modèles ou types de robinets sont plus susceptibles à la contamination. Également, l'étude semblait pertinente en raison du récent décret de la Régie du Bâtiment du Québec (RBQ) règlementant la température au point d'usage à 43°C dans certains cas. Finalement, la construction de plusieurs hôpitaux universitaires à Montréal appelle au choix d'un très grand nombre de robinets et il apparaissait urgent de vérifier si l'installation de robinets électroniques pouvait augmenter le risque d'exposition à *P. aeruginosa*.

Ce mémoire de maîtrise présente les résultats d'une étude de terrain visant à quantifier la présence de *P. aeruginosa* dans plus de 200 robinets échantillonnés en milieu hospitalier, dont la moitié sont des robinets électroniques. La fréquence et l'intensité de la contamination de *P. aeruginosa* ont été mesurées sur des modèles en place dans des éviers de quatre établissements, en ciblant, dans la mesure du possible, des secteurs avec des patients à risque. Un nombre important de paramètres ont été considérés au niveau du robinet, du drain et de la tuyauterie, de manière à bien circonscrire les autres variables pouvant favoriser la prolifération de *P. aeruginosa*. L'échantillonnage a été réalisé sur l'eau et le biofilm des drains et des aérateurs et deux méthodes de quantification de *P. aeruginosa* testées en parallèle. Une analyse séquentielle par petits volumes d'eau a ensuite été effectuée sur plusieurs points afin de déterminer d'où provenait la contamination : du robinet et sa conduite de raccord (contamination distale) ou plutôt du réseau de distribution (contamination systémique). Le projet a été complété par des essais au laboratoire sur des conduites en tressé flexible et des conduites de cuivre visant à établir l'importance de la nature des matériaux de connexion sur la susceptibilité à la contamination.

OBJECTIFS

L'étude a pour but d'approfondir les connaissances sur les facteurs déterminant la colonisation par *P. aeruginosa* des systèmes de distribution d'eau potable en milieu hospitalier et de comprendre si certains types de robinets sont plus susceptibles à la contamination.

Les objectifs spécifiques du projet sont:

1. Déterminer si les robinets électroniques sont davantage ou moins colonisés que les robinets conventionnels.
2. Évaluer si les conduites de raccordement ou certains paramètres physico-chimiques peuvent influencer la contamination au robinet.
3. Déterminer la zone de prolifération de *P. aeruginosa* dans l'ensemble du réseau d'eau froide.
4. Comparer deux méthodes de quantification de *P. aeruginosa*, soit une par culture (ISO 16266) et une nouvelle méthode par mesure d'activité enzymatique (Pseudalert, IDEXX™)

PLAN DU MÉMOIRE

Le premier chapitre est consacré à une revue de littérature présentant les concepts généraux sur lesquels reposent le projet de recherche et les détails concernant les robinets électroniques et leur colonisation par la bactérie *P. aeruginosa*. Le second chapitre propose la démarche du travail et élabore sur les étapes permettant d'atteindre les objectifs du mémoire. Le troisième chapitre est consacré à l'article soumis à la revue « Infection Control and Hospital Epidemiology ». Celui-ci inclut la plupart des résultats et réponses aux objectifs spécifiques du projet de recherche. Le quatrième chapitre correspond aux résultats complémentaires non présentés dans l'article. Le cinquième et dernier chapitre amène la discussion finale et les limitations du projet de recherche. Une conclusion et des recommandations viennent clore le mémoire.

Finalement un article additionnel auquel a participé la candidate se retrouve à l'Annexe 1. L'article intitulé 'Recovery of *Pseudomonas aeruginosa* culturability following copper- and chlorine-induced stress' par Bédard et al., a été publié dans la revue FEMS en 2014. Dans ce cas,

la candidate a participé aux essais de laboratoire qui visaient à préciser les limitations des méthodes de détection de la culture et de la détection enzymatique de *P. aeruginosa*.

CHAPITRE 1 REVUE DE LITTÉRATURE

Cette revue de littérature présente tout d'abord les orientations générales de conception et d'exploitation des systèmes d'eau potable dans les grands bâtiments. Cette introduction nous mène ensuite vers une mise en contexte et une compréhension technique du fonctionnement des robinets électroniques et de la tuyauterie de raccordement ainsi qu'une présentation des normes d'eau potable applicables aux éléments de plomberie. Dans un second temps, les grandes orientations pour protéger la santé des usagers des systèmes d'eau potable dans les établissements de santé sont présentées. Cette ouverture générale nous conduit vers la présentation de la bactérie *P. aeruginosa* ainsi que les normes microbiologiques de qualité de l'eau. Dans un dernier temps, le lien est fait entre la contamination de l'eau potable au robinet ou du système de distribution et les infections nosocomiales par *P. aeruginosa*. Cela permet ensuite de présenter les taux de prévalence recensés dans la littérature pour le biofilm, l'eau et selon les types de robinets.

1.1 Grandes orientations de conception et d'exploitation des systèmes d'eau potable dans les grands bâtiments

Le Québec s'est doté d'une politique nationale de l'eau en 2002 dans le but de préserver et gérer efficacement la ressource, mais également pour mieux protéger la santé publique et les écosystèmes (Ministère du Développement Durable de l'Environnement et des Parcs (MDDEP), 2002). La Stratégie québécoise d'économie d'eau potable qui en découle, publiée en 2011, propose des engagements afin d'atteindre un des objectifs principaux de la politique qui est de réduire d'au moins 20 % la consommation moyenne d'eau par personne par jour par rapport à la consommation de 2001 (Ministère des Affaires municipales, 2011). Dans ces engagements, on retrouve notamment une révision du code de la construction pour promouvoir l'installation d'équipements consommant moins d'eau et l'ajustement des débits maximum permis dans les robinets (8,35 Litres/minute), douches (9,5 L/minute) et toilettes (6 L par chasse). Aussi, pour les établissements de santé, un état de la situation et un plan d'action de réduction de la consommation devront avoir été complétés afin qu'un bilan de réalisation soit publié pour la fin de 2016 (Ministère des Affaires municipales, 2011). Le mot d'ordre général pour les établissements de santé est donc d'améliorer leur bilan de consommation d'eau potable.

Dans les dernières années, nombreuses sont les constructions ou les rénovations qui visent une certification de bâtiment durable. Les certifications reconnues ayant notamment dans leur mire la réduction de l'énergie et la consommation d'eau sont les suivantes: la certification Leadership in Energy and Environmental design (LEED) et le programme R-2000 de l'Office de l'efficacité énergétique du Ministère des Ressources naturelles du Canada. Un bâtiment ayant obtenu la certification LEED consomme environ 40 % à 50 % moins d'eau qu'un bâtiment conventionnel (Boucher et al., 2010). En somme, afin d'abaisser de moitié la consommation d'eau, il faut avoir recours à des systèmes de plomberie écoénergétiques; soit l'installation de toilettes et de robinetterie à débit réduit. Concrètement, plusieurs mesures peuvent être adoptées lorsqu'il est question de l'exploitation d'un système de distribution d'eau potable dans les établissements de santé: l'installation de douches, de robinets et de toilettes à débit réduit; l'utilisation d'aérateurs faisant passer le débit de l'ordre de 13,5 L/minute à un débit situé entre 6 à 9 L/minute; enfin, le remplacement des robinets conventionnels par des robinets électroniques. Ce dernier type de robinet permet de faire des économies d'eau considérables, car il offre un temps d'utilisation réduit par rapport à un robinet conventionnel. Notamment, il est réputé diminuer le débit de 8 L/minute à environ 5 L/minute ou moins (Boucher et al., 2010).

Le Comité permanent du code national de la plomberie fait actuellement une révision du code national de la plomberie pour 2015 et de nouvelles exigences pourraient être mises de l'avant. Entre autres, dans les établissements de santé, un débit maximum de 1,9 L/minute pourrait être exigé pour les robinets installés dans les toilettes publiques. Par contre, un débit de 5,7 L/minute serait maintenu dans les chambres de patients (Facility Guidelines Institute (FGI), 2013).

1.1.1 Mise en contexte sur les robinets électroniques

Les premières tentatives de développement de robinets électroniques ont été faites dans les années 1970, sans grand succès à cette époque à cause de la technologie trop dispendieuse et de l'installation compliquée des appareils. La production de ce type de robinet était mise de l'avant afin de limiter la propagation des bactéries en éliminant tout contact des mains avec le robinet, mais aussi pour répondre aux besoins des personnes à mobilité réduite. Le développement des robinets électroniques a connu une deuxième lancée vers la fin des années 1980, et un essor fulgurant à partir de 1992 suite à l'adoption par le gouvernement américain du « Energy Conservation Act of 1992 ». Ce dernier incluait des objectifs ambitieux de conservation d'eau et

d'énergie. Enfin, l'installation de ce type de robinets n'a cessé d'augmenter dans les années 2000, que ce soit dans les toilettes publiques des aéroports, des restaurants, des centres commerciaux ou dans les hôpitaux (McTargett, 2001).

La présence de robinets électroniques dans les établissements de santé est de plus en plus fréquente, que ce soit pour des remplacements ou l'installation de nouveaux équipements. Les robinets électroniques thermostatés ou à température pré-définie sont favorisés pour plusieurs raisons dont : la réduction de la consommation d'eau, la prévention de la contamination des mains du personnel soignant et la prévention des brûlures (Institut national de santé publique du Québec (INSPQ) & Gouvernement du Québec, 2009). Cette tendance répond aux objectifs énoncés dans la Stratégie québécoise d'économie d'eau potable et permet aux grands bâtiments de réduire leur consommation d'eau (Boucher et al., 2010). Dans certains lieux publics, il n'y a que de l'eau froide ou tiède qui coule des robinets électroniques, la robinetterie étant essentiellement prévue pour le lavage des mains.

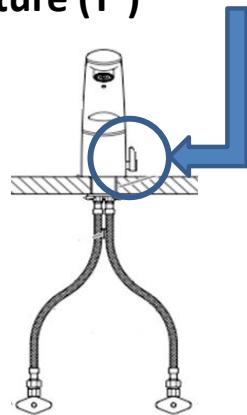
Les robinets électroniques comportent cinq composantes principales : le détecteur de présence, la valve solénoïde, la valve de mélange, la batterie et le bec. Les robinets fonctionnent grâce à l'activation du détecteur de présence, qui envoie une pulsation électrique à la valve solénoïde. Celle-ci transforme ensuite l'énergie électrique en énergie mécanique, permettant ainsi à l'eau de circuler et de sortir à l'extrémité du robinet. C'est par la valve de mélange que l'eau chaude et l'eau froide sont mitigées; celle-ci peut être placée en amont de la valve solénoïde ou avec celle-ci dans le robinet. La batterie, ou le branchement électrique, permet le fonctionnement du détecteur et de la valve solénoïde, les composantes énergivores et coûteuses de l'installation. Le bec peut loger l'ensemble des composantes, dépendamment de l'architecture plus ou moins complexe et du modèle de robinet (Institut national de santé publique du Québec (INSPQ) & Gouvernement du Québec, 2009).

La durabilité des robinets électroniques varie selon les marques et les conditions d'exploitation aux sites d'installation et leur activation n'est pas toujours aussi facile et rapide que ce que l'on souhaite. Spécifiquement, les clapets antiretour de l'eau froide et chaude brisent ou s'obstruent fréquemment dans ce type de robinet, car ils ne sont pas protégés contre les particules en circulation ou résistants aux changements de pressions rapides. Cette situation provoque des mélanges non souhaités de l'eau chaude et de l'eau froide. Il est d'ailleurs conseillé d'ajouter des

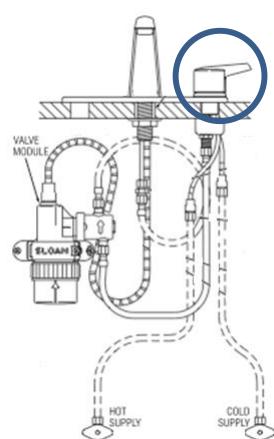
clapets supplémentaires sur l'arrivée de l'eau froide et de l'eau chaude, afin d'éviter le mélange entre les deux réseaux en cas de bris (République Française & Ministère de la Santé et des Solidarités, 2005).

Il existe une grande variété de robinets électroniques sur le marché, certains à contrôle de température manuel intégré ou séparé du corps du robinet, d'autres avec des dispositifs automatiques thermostatés avec une sélection de température prédéfinie à l'installation (Halabi et al., 2001). Les caractéristiques importantes permettant de distinguer les modèles disponibles sur le marché sont l'ajustement manuel possible ou non de la température et le lieu de mélange de l'eau chaude et de l'eau froide. Cette dernière caractéristique aura une influence sur le volume d'eau pouvant être tiède et propice à la prolifération de bactéries. La figure 1.1 présente les types de robinets électroniques ainsi que les modèles analysés dans les études de Merrer et al. et Halabi et al., qui n'offrent pas de contrôle manuel de la température (Halabi et al., 2001; Merrer et al., 2005).

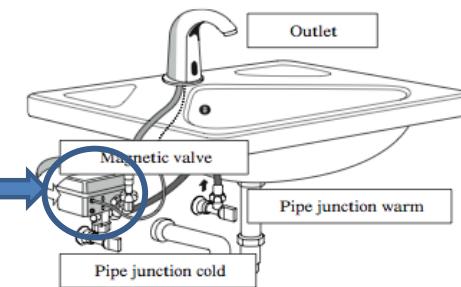
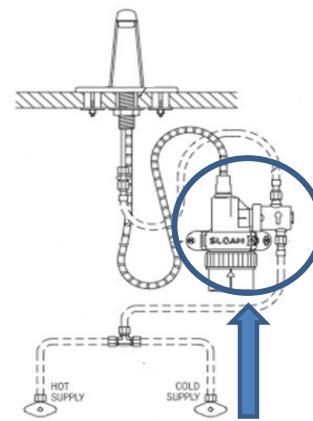
Électronique avec contrôle de température (T°)



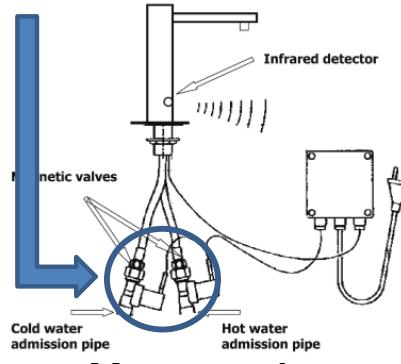
Électronique avec contrôle de T° séparé du robinet



Électroniques sans contrôle manuel de T°



Ajustement de la T°



Merrer et al.

Figure 1 Diagram of the non-touch fitting.

Halabi et al.

Figure 1.1 Contrôle de la température dans différents types de robinets électroniques (Halabi et al., 2001; Merrer et al., 2005; SLOAN, 2010).

1.1.2 Plomberie de raccordement

Divers types de matériaux peuvent être utilisés pour alimenter un robinet en eau chaude et en eau froide; le cuivre, le polychlorure de vinyle (PVC) standard ou surchloré, le polyéthylène réticulé haute densité (PER ou PEX à l'international) ou les tressés flexibles avec résine élastomère (Adto & Cordler, 2012). Le cuivre était le plus fréquemment utilisé mais ses coûts élevés tant à l'achat et pour l'installation ont mené à l'adoption généralisée de nouveaux matériaux synthétiques.

L'installation de conduites de raccordement en tressé flexible est désormais très populaire et ces conduites sont souvent déjà connectées au robinet lors de l'achat. Ce type de tuyauterie est avantageux par rapport au cuivre puisqu'il peut être installé pratiquement n'importe où, y compris dans les endroits restreints. Il offre une bonne résistance à la pression et sa longueur importe peu puisqu'il suffit de le rouler s'il est trop long, contrairement au cuivre qui nécessite une mesure précise et de la soudure (Adto & Cordler, 2012). Le diamètre de ce type de tuyauterie est généralement de 9,5 mm ou 12,7 mm (3/8 ou 1/2 pouce) et la longueur typiquement de 305 mm (12 pouces) (Institut national de santé publique du Québec (INSPQ) & Gouvernement du Québec, 2009).

Les tressés flexibles sont composés d'une conduite en caoutchouc synthétique à l'intérieur, appelé résine élastomère, qui est recouverte d'un tube en acier tressé. La composition de la résine élastomère, peut varier selon les marques disponibles sur le marché, certains sont composés d'éthylène propylène diène monomère (EPDM).

En 2006, au Royaume-Uni, l'installation de raccord en tressé flexible fabriqué avec de l'EPDM a été interdite (Health Facilities Scotland (HFS), 2009). Cela faisait suite à des rapports indiquant que ce matériel dégage des nutriments pour les bactéries, il est rugueux et favorise l'installation d'un biofilm et il modifie la couleur et l'odeur de l'eau (Water Regulations Advisory Scheme (WRAS), 2006). L'utilisation de ce matériau en eau potable a depuis été autorisée dans la mesure où les éléments de plomberie (vannes, conduites, joints d'étanchéité, etc.) d'EPDM ont été testés et approuvés par le Water Regulations Advisory Scheme (2011).

1.1.3 Normes d'eau potable applicables aux éléments de plomberie

Depuis 2008, les produits de plomberie qui entrent en contact avec de l'eau destinée à la consommation humaine doivent être conformes aux normes canadiennes, car il est interdit de vendre sur le marché des équipements non certifiés (Régie du bâtiment du Québec (RBQ), 2014). Les principaux organismes approuvés par Santé Canada et pouvant accréditer les éléments de plomberie à la norme NSF/ANSI 61 « Composants de système d'eau potable – Effets sur la santé » sont les suivants : Canadian Standard Association (CSA) International, NSF international, Water Quality Association, le Bureau de normalisation du Québec (BNQ), Underwriters Laboratories Inc. and Quality Auditing Institute (Régie du bâtiment du Québec (RBQ), 2014).

Pour limiter les effets possibles sur la santé, la norme NSF/ANSI 61 établit les concentrations maximum admissibles des contaminants chimiques présents dans les matériaux qui entrent en contact avec l'eau potable. La liste des analyses requises dépend des types de matériaux employés dans la fabrication d'un produit. Notons que, la norme n'estime pas la performance du produit, ni les goûts ou les odeurs que pourraient laisser certains matériaux dans l'eau. De plus, elle n'évalue pas si le produit favorise ou non la croissance bactérienne sur le matériel (NSF International Standard & American National Standard (ANSI), 2007).

Les robinets mis sur le marché doivent se conformer à la norme CAN/CSA – B125.1- 05 « Robinets ». Les robinets de douche ou baignoire desservant des personnes à risque doivent être pré-ajustés pour avoir une température de sortie de 43 °C, soit par un mélangeur thermostatique ou par un limiteur de température automatique (Régie du bâtiment du Québec (RBQ), 2014) .

Le Règlement sur la qualité de l'eau potable fixe également des valeurs limites permises dans l'eau pour des substances organiques et inorganiques. Par exemple, la concentration maximale de cuivre permise est de 1 mg/L après 5 minutes d'écoulement tandis que le plomb ne doit pas être supérieur à 0,010 mg/L (Ministère du Développement Durable de l'Environnement et des Parcs (MDDEP), 2010). Aux États-Unis, la concentration maximale légale de cuivre dans l'eau est de 1,3 mg/L. Toutefois, l'agence de protection environnementale de la Californie propose un objectif de santé publique de 0,3 mg/L fondé sur la l'exposition considérée sans effet sur les nourrissons (California Environmental Protection Agency et al., 2008).

1.2 Grandes orientations pour protéger la santé des usagers des systèmes d'eau potable dans les établissements de santé

Les systèmes de distribution d'eau potable d'un établissement de santé doivent être en mesure d'offrir et préserver une bonne qualité de l'eau en tout temps et en tout lieu puisqu'ils desservent des populations à risque. Dans cette optique, plusieurs mesures sont proposées afin de préserver la santé des usagers des systèmes de distribution d'eau potable. Celles-ci touchent notamment, les brûlures et la température, la conception des systèmes de distribution, la robinetterie et le contrôle des pathogènes.

Tout d'abord, afin de réduire les risques de brûlures chez les patients vulnérables, une nouvelle règlementation promulguée par un décret de la Régie du Bâtiment du Québec en 2013 exige que la température soit maintenue sous le seuil de 43 °C dans les douches et les baignoires (Gouvernement du Québec, 2012). D'autre part, le Code de construction du Québec exige (quant à la section 2.6 du chapitre III sur la plomberie) le maintien d'une température supérieure à 60 °C en sortie de chauffe-eau dans tous les bâtiments et supérieure à 55 °C dans les boucles de recirculation d'eau chaude des nouveaux bâtiments et des agrandissements (Régie du bâtiment du Québec (RBQ), 2014). Cela vise à minimiser les variations thermiques dans le réseau et éviter les plages de température (entre 20 °C et 45 °C) propices à la croissance bactérienne (British Standards Institution (BSI), 2011). Dans la communauté internationale, des exigences similaires sont énumérées pour le contrôle de la Légionnelle et afin de protéger les patients vulnérables. Les réglementations touchent elles aussi à la température de l'eau chaude; soit à la sortie des chauffe-eau, soit dans les boucles de recirculation ou dans le réseau de distribution. Également, une température sous les 20 °C ou 25 °C pour l'eau froide est préconisée (Bartram et al., 2007; Centers for Disease Control (CDC), 2003; Department of Health (DH) & Estates and Facilities Division, 2006b).

Quant à la conception des réseaux internes de distribution d'eau potable, il est suggéré d'opter pour une structure la plus simpliste et courte possible. Cela permet de gérer efficacement des facteurs déterminants pour la qualité de l'eau et le contrôle des bactéries; soit maintenir la température de l'eau chaude en tout point du réseau, s'assurer que l'eau froide reste froide, assurer une bonne circulation de l'eau dans le réseau et donc éviter de longues périodes de stagnation et pouvoir effectuer une désinfection efficace lorsque nécessaire (Centers for Disease

Control (CDC), 2003; Health and Safety Executive (HSE), 2013; République Française, 2005). Il est également mentionné d'éviter des matériaux qui relâchent des nutriments dans l'eau ou ceux pouvant être des supports idéaux pour les bactéries, tels que certaines connexions de plomberie ou certains aérateurs (British Standards Institution (BSI), 2011).

Au niveau des points d'utilisation et donc de la robinetterie, il est conseillé d'installer des robinets avec de petits becs pour limiter les volumes stagnants. Il convient également de supprimer les points d'eau qui sont peu utilisés (République Française, 2005) et de faire une purge aux robinets chaque semaine ou juste avant l'utilisation pour ceux ayant une faible utilisation (Department of Health (DH) & Estates and Facilities Division, 2006a). De plus, afin d'éliminer une partie de la charge bactérienne, il faut éviter d'avoir de l'eau stagnante dans les robinets, les douches ou les bouts morts et être en mesure d'effectuer des rinçages efficaces à l'eau chaude (British Standards Institution (BSI), 2011). Il faut donc éviter les dispositifs à débit réduit, tels que les robinets électroniques, car ils ne favorisent pas la circulation vigoureuse de l'eau et un rinçage efficace. D'ailleurs, une mise en garde sur les robinets électroniques a été publiée par un regroupement d'organismes américain en 2011 et recommande de plus amples études afin de comprendre pourquoi ces types de robinets semblent plus propices à la contamination que les modèles conventionnels (ASHE et al., 2011). De plus l'Institut National Scientifique de la Santé Publique a émis un avertissement au sujet de l'utilisation des robinets électroniques (Institut national de santé publique du Québec (INSPQ) & Gouvernement du Québec, 2009). Le comité sur les infections nosocomiales du Québec remet en question l'utilisation des robinets électroniques au détriment des robinets à pédales, à genou ou à coude. Les aérateurs sont également déconseillés à cause des dépôts de particules et du biofilm qui se forme à l'intérieur. Ils favorisent aussi la formation d'aérosols pouvant être bénéfiques à certains microorganismes, tels que *L. pneumophila* et *P. aeruginosa* lesquels se propagent par voie aérienne (British Standards Institution (BSI), 2011; Institut national de santé publique du Québec (INSPQ) & Gouvernement du Québec, 2009).

Au niveau international, des nombreux règlements et guides ont été publiés pour préciser les actions à prendre pour contrôler l'amplification de *L. pneumophila* ou de *P. aeruginosa* (Centers for Disease Control (CDC), 2005; Department of Health (DH) et al., 2013; Department of Health (DH) & Estates and Facilities Division, 2006a; The European Working Group for Legionella Infections (EWGLI) et al., 2011). Ces guides englobent les éléments cités précédemment et

proposent des mesures additionnelles. Certains recommandent de nettoyer et de désinfecter les aérateurs pour contrôler *L. pneumophila* (McCoy, 2005). Le CDC préconise notamment des purges préventives à l'eau chaude entre 71 et 77 °C ou d'ajouter un traitement chimique supplémentaire, par exemple, en maintenant un résiduel de chlore de 1 à 2 mg/L dans l'eau pour les unités avec des patients à risques. De façon à prévenir les éclosions de *L. pneumophila*, il est également conseillé de procéder à un échantillonnage préventif sur l'eau et sur des patients plus à risque (Centers for Disease Control (CDC), 2005).

1.2.1 Mise en contexte sur *Pseudomonas aeruginosa*

La bactérie Gram négatif *P. aeruginosa* est omniprésente dans l'environnement, notamment dans les sols, les milieux humides et dans l'eau (Kerr & Snelling, 2009). Une quantité importante est ingérée chaque jour par l'humain dû à sa présence sur les plantes et les légumes (Hardalo & Edberg, 1997). Bien que les conditions environnementales soient peu clémentes à cette bactérie dans la tuyauterie des établissements de santé, celle-ci s'y loge en faible quantité, dans l'eau ou dans le biofilm. Cela est dû à ses capacités étonnantes de survie et sa facilité à intégrer le biofilm (Kerr & Snelling, 2009). Même si *P. aeruginosa* se retrouve principalement dans le biofilm, elle est très mobile et tend à coloniser des sites plus riches en nutriments. Par conséquent, elle se détache du biofilm et se retrouve libre dans l'eau. Elle peut se reproduire autant dans de l'eau stagnante que sur une surface humide. Elle se distingue des autres types de pseudomonades par sa production de pyocyanine (pigment vert bleu) et de pyoverdine (pigment jaune vert fluorescent) (Hardalo & Edberg, 1997).

Les concentrations de *P. aeruginosa* sont en général trop faibles dans l'environnement pour présenter un risque chez les individus en bonne santé. Des conditions environnementales spécifiques doivent être réunies pour qu'une prolifération se produise, constitue une exposition significative et mène à une infection. Entre autres, la concentration de *P. aeruginosa* doit être élevée, la bactérie doit être virulente, et l'hôte doit être susceptible comme par exemple, un patient immuno-déficient ayant des tissus ou organes préalablement endommagés (Hardalo & Edberg, 1997).

Certains types de patients sont particulièrement vulnérables aux infections par *P. aeruginosa*: les nouveau-nés, les patients atteints de fibrose kystique, les grands brûlés, les patients soumis à des procédures invasives (cathéters, tubes endo-trachéens, ventilateurs, etc.) et les immunodéprimés.

La bactérie est responsable de plusieurs types d'infection. Celles-ci touchent principalement aux voies respiratoires ou pulmonaires, au système urinaire, aux brûlures, aux plaies ouvertes ou aux septicémies (infection du sang) (Mena & Gerba, 2009).

Plusieurs études ont montré une concordance entre les souches environnementales et cliniques et ont établi que les robinets et les drains peuvent être contaminés. Cependant, elles ne précisent pas clairement la voie d'infection (évier-patient ou patient-évier) (Loveday et al., 2014). Il y a trois modes de transmission possible : 1) par contact direct avec de l'eau (par ingestion, lavage ou éclaboussures provenant du robinet); 2) par des aérosols (respirateur, douche, ventilateur); 3) par contact indirect (équipement lavé avec de l'eau contaminée ou mains du personnel soignant) (Department of Health (DH) et al., 2013).

La plage de température idéale permettant la croissance de *P. aeruginosa* se situe entre 10°C et 42°C (Brown, 1957). En dessous et au-dessus de ces températures, la bactérie survit, mais cesse de croître. Toutefois, l'efficacité de l'inactivation thermique baisse rapidement au-dessous de 55°C (Spinks et al., 2006). *P. aeruginosa* a développé une résistance à certains antibiotiques et désinfectants et est plus difficilement éradiquée lorsqu'elle est établie dans le biofilm (Kerr & Snelling, 2009; Mena & Gerba, 2009). De plus, la présence de chlore résiduel et la concentration de cuivre dans l'eau sont des facteurs environnementaux influençant la cultivabilité de *P. aeruginosa* (Bédard et al., 2014; Dwidjosiswojo et al., 2011). Plus précisément, dans l'étude de Bédard et al. à laquelle nous avons participé, ici présentée à l'Annexe 1, l'effet du chlore et du cuivre sur la bactérie a été étudié lors d'expériences en laboratoire. Il a été montré que le chlore cause de la mortalité chez la bactérie, mais que la croissance de *P. aeruginosa* reprend dès qu'il n'y a plus de résiduel de chlore. Contrairement au chlore, en présence de cuivre, la bactérie entre dans un état où elle est viable, mais non culturable (« viable but non culturable », VBNC) et redevient cultivable lorsque le cuivre est chélaté (Bédard et al., 2014) .

1.2.2 Normes microbiologiques de qualité d'eau

Il n'y a pas de norme ou de directive concernant la prévalence ou les concentrations de *P. aeruginosa* admissibles aux points d'usage dans les établissements de santé et pour l'eau embouteillée au Québec. Un recensement volontaire est effectué dans les hôpitaux pour obtenir les taux d'incidences de plusieurs bactéries, dont les espèces de pseudomonades, mais il n'y a pas

de statistiques spécifiques à *P. aeruginosa* (Institut national de santé Publique du Québec (INSPQ), 2013). Le constat est le même du côté des États-Unis (Hardalo & Edberg, 1997).

Toutefois, certains pays ont émis des directives de qualité microbiologique selon les types de soins qui comprennent des recommandations concernant *P. aeruginosa* (République Française & Ministère de la Santé et des Solidarités, 2005). Des directives spécifiques pour le contrôle de cette bactérie ont été récemment émises par le gouvernement du Royaume-Uni suite à des éclosions en soins néonataux dans plusieurs hôpitaux irlandais. Ces directives comprennent des objectifs de suivi de l'eau au premier jet et après rinçage ainsi que des seuils d'action pour les aires desservant des patients vulnérables dont : une obligation de suivi intensifié après une mesure de 1-10 UFC/100mL et une obligation de correctifs immédiats avec une concentration de plus de 10 UFC/100mL (Department of Health (DH) et al., 2013).

1.3 Les infections nosocomiales par *P. aeruginosa* reliées à la contamination de l'eau potable ou du système de distribution

La prolifération de pathogènes opportunistes peut s'effectuer dans l'ensemble d'un réseau interne de bâtiment ou seulement à ses extrémités. On distingue alors une contamination systémique d'une contamination distale. Dans une récente étude, le premier jet d'une température souvent tiède était plus susceptible d'être contaminé par *Pseudomonas species* ou *Legionella*, que l'analyse de l'eau après une purge de 3 minutes d'eau chaude (Serrano-Suarez et al., 2013). La prolifération de légionnelles dans un réseau d'eau chaude se produit dans l'ensemble du réseau avec une certaine amplification distale (Cristina et al., 2014). *P. aeruginosa* est typiquement présent en faible concentration dans les eaux potables et colonise ensuite le réseau d'eau froide et les robinets d'un grand bâtiment, principalement sous forme de biofilm (Cristina et al., 2014).

Dans la dernière décennie, de nombreuses études ont quantifié la prévalence et les concentrations de *P. aeruginosa* dans l'eau ou le biofilm du robinet, des douches et des drains dans les établissements de santé. On évalue qu'environ 30 % à 50 % des infections nosocomiales au *P. aeruginosa* en soins intensifs seraient reliées à l'eau (Exner et al., 2005). Les résultats de certaines études permettent même de faire des liens entre les souches de *P. aeruginosa* qui ont causé une infection chez un patient et les souches environnementales retrouvées dans l'eau du robinet (Durojaiye et al., 2011; Ehrhardt et al., 2006; Walker et al., 2014; Yapicioglu et al.,

2011). D'autres ont comparé les prévalences dans l'eau des robinets électroniques par rapport à celles obtenues dans les robinets conventionnels.

Les sections suivantes sont consacrées aux résultats de prévalence dans le biofilm, dans l'eau et selon les types de robinets échantillonnés. Également, une section fait ressortir les analyses entre les conduites de raccordement en cuivre et ceux en tressé flexible.

1.3.1 Résultats de prévalence de *P. aeruginosa* dans le biofilm

Les niveaux de contamination rapportés dans des échantillons de biofilm prélevés de drains, de robinets ou d'aérateurs varient grandement, soit de 4 % à 100 % de contamination (Blanc et al., 2004; Döring et al., 1991; Hota et al., 2009; Lavenir et al., 2008; (Levin et al., 1984); Vianelli et al., 2006; Walker et al., 2014). Les études rapportent des résultats d'enquêtes de plus ou moins grande ampleur au niveau du nombre des échantillons; le nombre de sites échantillonnés variant de 11 drains (Levin et al., 1984) à 302 drains (Regnath et al., 2004). La durée de suivi des études fluctue énormément, pouvant aller de quelques semaines (Döring et al., 1991) à un an (Blanc et al., 2004). De plus, certaines études sont des enquêtes environnementales suivant une éclosion, donc des suivis en situation de contamination intense (Ehrhardt et al., 2006; Hota et al., 2009; Schneider et al., 2012; Walker et al., 2014).

Parmi les études les plus importantes (>100 points de suivis) et les plus récentes, on note que les prévalences dans le biofilm sont moins élevées : 9,7 % avec 216 robinets (Blanc et al., 2004), 12,2 % dans 213 drains (Hota et al., 2009) et 36 % dans 302 drains (Regnath et al., 2004). Au niveau des études qui ont spécifiquement ciblé les aérateurs, les niveaux de contamination varient de 31 % à 74 % (Ehrhardt et al., 2006; Lavenir et al., 2008; Walker et al., 2014), tandis qu'ils sont moins élevés, entre 4 % et 48 %, dans le cas des robinets. Le tableau 1.1 présente un résumé des résultats de prévalence de *P. aeruginosa* dans le biofilm des drains, des robinets et des aérateurs pour les multiples études recensées.

Dans une étude récente (Walker et al., 2014), l'objectif était d'identifier les composantes les plus susceptibles de contribuer à une contamination par *P. aeruginosa*. Dans cette étude, trente robinets et leur plomberie de raccordement ont été démantelés en 494 composantes. Ils provenaient d'hôpitaux dans lesquels des éclosions de *P. aeruginosa* ont eu lieu en 2011-2012, dans les unités néonatales. Les pièces les plus fréquemment contaminées étaient les aérateurs. Les

aérateurs complexes Neoperl, composés principalement d'acétal, d'EPDM et de silicium, étaient extrêmement propices à l'accumulation de biofilm contaminé par *P. aeruginosa*.

1.3.2 Résultats de prévalence de *P. aeruginosa* dans l'eau

En ce qui a trait à la contamination de l'eau prélevée au robinet évaluée par culture, les prévalences rapportées dans la littérature scientifique sont beaucoup plus faibles que celles dans le biofilm variant entre 1 % et 18 % de positifs pour des études ayant analysées plus de 25 robinets (Cholley et al., 2008; Ferroni et al., 1998; Merrer et al., 2005; Rogues et al., 2007). Le tableau 1.2 présente les résultats de prévalence de *P. aeruginosa* dans l'eau prélevée au robinet dans des établissements de santé. L'étude de Ferroni et al., présente des mesures répétées à 118 sites et montre qu'un nombre important d'échantillons d'eau prélevés au robinet et dans le réseau de distribution de l'hôpital 21/118 (18 %) étaient positifs (Ferroni et al., 1998).

Tableau 1.1 Prévalences (%) de *P. aeruginosa* observées dans l'écouvillonnage de biofilm des drains, des robinets et des aérateurs

Biofilm	Localisation du biofilm	Prévalence (%)	Nb. + / Nb. Total	Référence
Drains	Drains	12 %	26/213	(Hota et al., 2009)
		25 %	3/12	(Schneider et al., 2012)
		36 %	109/302	(Regnath et al., 2004)
		74 %	25/34	(Döring et al., 1991)
		78 %	18/23	(Vianelli et al., 2006)
		100 %	11/11	(Levin et al., 1984)
Robinets	Robinets	4 %	2/53	(Hota et al., 2009)
		10 %	21/216	(Blanc et al., 2004)
		14 %	68/482 (composantes)	(Walker et al., 2014)
		48 %	11/23	(Vianelli et al., 2006)
Aérateurs	Aérateurs	31 %	18/59	(Ehrhardt et al., 2006)
		42 %	41/97 (composantes)	(Walker et al., 2014)
		74 %	39/53	(Lavenir et al., 2008)

Tableau 1.2 Résultats de prévalence (%) de *P. aeruginosa* dans l'eau aux robinets (études de plus de 25 robinets)

Eau	Prévalence (%)	(Nb.+ / Nb. Total)	Volume échantillonné (mL)	Référence
Eau	1 %	2/135	100 mL	(Merrer et al., 2005)
	4,5 %	10/224	150 mL	(Cholley et al., 2008)
	10 %	65/673	250 mL + écouvillon de l'aérateur	(Rogues et al., 2007)
	18 %	21/118	50 mL	(Ferroni et al., 1998)

1.3.3 Résultats de prévalence de *P. aeruginosa* selon les types de robinets

Plusieurs études de cas menées dans de nombreux pays ont récemment démontré que les robinets électroniques sont plus susceptibles à la colonisation par *P. aeruginosa* que les robinets conventionnels et que cette colonisation peut entraîner des éclosions nosocomiales. Nous avons identifié onze études sur l'impact du type de robinets sur la colonisation par *P. aeruginosa* (Assadian et al., 2002; Berthelot et al., 2006; Chaberny & Gastmeier, 2004; Durojaiye et al., 2011; Ehrhardt et al., 2006; Halabi et al., 2001; Leprat et al., 2003; Merrer et al., 2005; Van der Mee-Marquet et al., 2005; Walker et al., 2014; Yapicioglu et al., 2011). Plusieurs de ces études comportent toutefois, un faible nombre d'analyses (<10 robinets échantillonnés); (Berthelot et al., 2006; Durojaiye et al., 2011; Leprat et al., 2003; Yapicioglu et al., 2011). Les résultats de prévalences de *P. aeruginosa* selon les types de robinets sont présentés au tableau 1.3. De ces études, une seule conclut à l'absence de différences de susceptibilité à la colonisation (Assadian et al., 2002) alors que quatre études relient directement la contamination de robinets électroniques

à des cas cliniques (Durojaiye et al., 2011; Ehrhardt et al., 2006; Walker et al., 2014; Yapicioglu et al., 2011).

Tableau 1.3 Résultats de prévalences (%) de *P. aeruginosa* selon les types de robinets

Types de robinet*	Prévalence (%)	Nb. + / Nb. Total	Volume (mL) échantillonné	Référence
RC	0 %	0/10	500 mL	(Halabi et al., 2001)
RE	100 %	10/10		
RE avec contrôle T°	7 %	1/15		
RE sans contrôle T°	74 %	17/23		
RE	100 %	9/9	N.D.	(Yapicioglu et al., 2011)
RC	0 %	N.D.		
RE	12 %	3/27	500 mL	(Chaberny & Gastmeier, 2004)
RE	100 %	31/31	100 mL	(Van der Mee-Marquet et al., 2005)
RC	0 %	0/33		
RE	100 %	3/3	N.D.	(Leprat et al., 2003)
RC	0 %	N.D.		
RE	100 %	10/10	N.D.	(Durojaiye et al., 2011)
RE	39 %	36/92	100 mL	(Merrer et al., 2005)
RC	1 %	2/135		
RE	0 %	0/18	250 mL	(Assadian et al., 2002)
RC	6 %	1/18		
RE (composantes)	16 %	63/395	Biofilm	(Walker et al., 2014)
RC (composantes)	7 %	7/97		
RE	100 %	1/1	250 mL	(Berthelot et al., 2006)
RC	0 %	0/1		
RE (biofilm)	37 %	18/49	Biofilm	(Ehrhardt et al., 2006)
RE (eau)	0 %	0/2	N.D.	

*RE = robinet électronique, RC= robinet conventionnel, N.D. = Non Disponible

Plusieurs hypothèses sont énoncées dans la littérature pour expliquer la contamination accrue des robinets électroniques par rapport aux robinets conventionnels. Au nombre de ces hypothèses, la faible quantité d'eau qui circule dans ces robinets ne serait pas en mesure d'éliminer les bactéries

et laisserait la voie libre à la croissance bactérienne. Aussi, dans certains modèles, la température est maintenue autour de 35 °C; une température idéale de croissance pour plusieurs bactéries. Cette température n'est d'ailleurs pas assez élevée pour qu'une purge efficace des bactéries soit effectuée dans le robinet (Halabi et al., 2001; Merrer et al., 2005). Également, les matériaux internes, utilisés dans la conception des robinets et plus particulièrement dans la valve solénoïde, seraient des supports idéaux pour l'installation de biofilm (Berthelot et al., 2006). Les membranes de caoutchouc, le plastique et le PVC font partie des matériaux ciblés qui sont difficiles à désinfecter (Halabi et al., 2001). Également, le volume stagnant pouvant être plus ou moins important selon les types de robinets électroniques pourrait expliquer en partie la contamination de certains modèles (Mäkinen et al., 2013).

Dans une des plus importantes études (Merrer et al., 2005), plus de 200 robinets ont été échantillonnés : 39 % des robinets électroniques étaient contaminés par *P. aeruginosa* contre 1 % des robinets conventionnels. Trois marques de robinets électroniques ont été analysées et tous les robinets étaient munis d'un dispositif permettant un ajustement préalable de la température lors de l'installation.

Entre autres, Halabi et al. ont comparé deux types de robinets électroniques, soit un modèle ayant un dispositif sur le côté du robinet permettant un ajustement manuel de la température et l'autre ayant un contrôle placé sous le lavabo ne permettant que l'ajustement lors de l'installation. L'eau provenant des robinets avec un contrôle manuel de température était contaminée dans 7 % des cas, tandis que 74 % de ceux n'ayant pas de contrôle étaient contaminés (Halabi et al., 2001).

Dans l'étude de Walker et al. (2014) les résultats démontrent que les robinets électroniques étaient plus souvent contaminés avec 15,9 % de leurs composantes positives pour *P. aeruginosa* versus 7,2 % pour les robinets manuels. Le modèle de robinet électronique de l'étude avait également une température ajustée à l'installation. Aussi, ce modèle présentait un long bout de tuyauterie mitigé entre l'eau froide et chaude pouvant être propice au développement de bactéries (Walker et al., 2014).

1.3.4 Contamination des conduites de raccordement de plomberie en tressé flexible

Selon des études réalisées en laboratoire, les conduites tressées flexibles, fabriquées d'une résine élastomère, sont plus susceptibles à la contamination que le cuivre. Certains plastiques utilisés pour les conduites de raccordement comme le polyéthylène, le polypropylène et l'éthylène-propylène peuvent supporter la croissance bactérienne et favoriser la prolifération d'un biofilm de *P. aeruginosa* (Bressler et al., 2009; Colbourne, 1985; Kilb et al., 2003; M.M. Moritz et al., 2010; Rogers et al., 1994a; Tsvetanova & Hoekstra, 2010)

Par ailleurs, l'étude de Walker et al. montre que les conduites tressées flexibles étaient plus fréquemment contaminées que les conduites de cuivre; 29 % des composantes provenant des tressés flexibles étaient contaminés contre 4,5 % pour le cuivre (Walker et al., 2014).

La revue de littérature a permis de mettre en lumière les résultats de prévalence de *P. aeruginosa* pour le biofilm, l'eau et selon les types de robinet. Peu d'études ont complété une comparaison de prévalence de *P. aeruginosa* dans l'eau pour différents types de robinet, pour un nombre important d'échantillon, selon plus d'une méthode de quantification et en tenant compte de nombreux paramètres physico-chimiques. Le prochain chapitre présentera la méthodologie employée pour l'ensemble du projet de recherche décortiquée selon les objectifs précédemment énumérés.

CHAPITRE 2 DÉMARCHE DE L'ENSEMBLE DU TRAVAIL DE RECHERCHE

Ce chapitre est consacré à décrire la démarche du projet de recherche, décortiquée selon les objectifs du projet et les étapes requises pour y répondre. La démarche du projet est construite autour d'une partie prédominante, une grande campagne d'échantillonnage, permettant de répondre au premier objectif. D'autres activités ont ensuite été complétées pour approfondir trois aspects et compléter les réponses aux autres objectifs spécifiques. L'ensemble du projet a permis de publier un article, d'être coauteur sur un second et de proposer des recommandations aux établissements de santé quant au choix de robinetteries et tuyauteries.

2.1 Contamination par *P. aeruginosa* selon les types de robinet et suivi des paramètres physico-chimiques de l'eau

La caractérisation des points d'utilisation dans les établissements de santé ainsi que la grande campagne d'échantillonnage complète la partie principale du projet.

2.1.1 Caractérisation dans les établissements de santé

Cette étape préliminaire, réalisée au printemps 2013, a permis de faire les premiers contacts avec les responsables des établissements de santé visés, de repérer les robinets électroniques et conventionnels qui seraient échantillonnés et de cibler, si possible, les secteurs avec des patients à risque. Un protocole de caractérisation a été suivi pour recueillir toutes les informations reliées aux robinets, aux drains et aux conduites de raccordement. Ces caractéristiques sur les points d'utilisation étaient nécessaires afin de compléter les analyses reliées au projet. Certaines mesures des paramètres physico-chimiques étaient également recueillies lors de ces visites, notamment les mesures de débit et de concentrations de cuivre dans l'eau.

2.1.2 Campagne d'échantillonnage

Durant l'été 2013, des protocoles d'échantillonnage et de laboratoire ont été suivis lors des journées de prélèvements dans les établissements de santé afin de guider les stagiaires participant au projet. L'ordre d'écouvillonnage du drain, le prélèvement de l'eau au robinet et l'écouvillonnage de l'aérateur devait être respecté. Les mesures des paramètres physico-

chimiques manquantes étaient recueillies. En culture, le protocole ISO 16266 a été suivi tandis que les instructions du manufacturier ont été respectées pour la détection enzymatique. La méthodologie et les résultats sont présentés dans l'article au chapitre 3.

Les résultats de la campagne d'échantillonnage fournissent les données nécessaires afin de répondre au premier objectif : des taux de prévalence entre les robinets électroniques et les robinets conventionnels ont pu être comptabilisés. Également, l'évaluation des paramètres physico-chimiques mesurés dans cette campagne permet de répondre en partie à l'objectif deux du projet.

2.2 Déterminer la zone de prolifération de *P. aeruginosa* dans les réseaux d'eau froide.

Afin d'identifier la zone de prolifération de *P. aeruginosa* dans les réseaux d'eau froide, un échantillonnage séquentiel, par prélèvement de volumes subséquents, les uns après les autres, a été réalisé sur certains robinets positifs à *P. aeruginosa* lors de la campagne principale. Cet échantillonnage complémentaire a été complété à 3 robinets contaminés dans 3 établissements différents. Grâce à la compréhension approfondie sur la contamination distale et systémique des réseaux d'eau froide, il a été possible de compléter les réponses à un des objectifs du projet. La méthodologie et les résultats de cette étape sont également présentés dans l'article au chapitre 3.

2.3 Évaluer si les conduites de raccordement sont propices à la contamination par *P. aeruginosa*

Afin de valider si les conduites de raccordement de type tressé flexible utilisées dans les établissements de santé faisant partie de l'étude étaient plus propices à la contamination que les conduites de cuivre, des essais ont été complétés au laboratoire. Suite aux résultats de cette expérimentation supplémentaire, ainsi que des résultats disponibles dans les publications consultées, des réponses ont permis d'atteindre un autre des objectifs du projet. Comme à la section précédente, les procédures et les résultats sont imbriqués dans l'article.

2.4 Comparaison de deux méthodes de quantification de *P. aeruginosa*

La comparaison des deux méthodes de quantification de *P. aeruginosa*, la culture et la détection enzymatique, a pu être parachevée suite à des essais au laboratoire ainsi qu'avec les résultats de la campagne d'échantillonnage. Ces étapes ont permis de répondre au dernier objectif du projet.

2.4.1 Essais au laboratoire

Afin d'établir un comparatif entre ces deux méthodes, quant à l'influence du chlore et du cuivre sur celles-ci, des essais distincts ont été réalisés au laboratoire. Ces essais ont mené à la rédaction d'un article, publié par ma collègue Émilie Bédard et dont je suis également coauteure. Tous les détails concernant l'expérimentation sont disponibles dans l'article à l'annexe 1.

2.4.2 Campagne d'échantillonnage

Les résultats de prévalence de *P. aeruginosa* dans l'eau pour la culture et la détection enzymatique ont été obtenus lors de la campagne d'échantillonnage principale et permettent de comparer les deux méthodes quant à la fréquence et les niveaux de contamination. Ces résultats sont présentés dans l'article et dans les données complémentaires à l'article au chapitre 4.

CHAPITRE 3 ARTICLE 1: IMPACT OF ELECTRONIC FAUCETS AND WATER QUALITY ON THE OCCURRENCE OF *PSEUDOMONAS* *AERUGINOSA*: A MULTI-HOSPITAL STUDY

Dominique Charron (B.Sc.)¹, Emilie Bédard (M.Sc.A.)^{1,2}, Cindy Lalancette (Ph.D.)², Céline Laferrière (M.D.)³ and Michèle Prévost (Ph.D.)¹

¹Department of Civil Engineering, Polytechnique Montreal, Montreal, Quebec, Canada

²INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, Quebec, Canada

³Department of Microbiology and Immunology (Infection control), CHU Ste-Justine, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada

Abstract

OBJECTIVE. To compare *Pseudomonas aeruginosa* prevalence in electronic and manual faucets and assess the influence of connecting pipes and water quality.

SETTING. Faucets in four healthcare centers in Quebec, Canada.

METHODS. Water samples from 105 electronic, 90 manual and 14 foot operated faucets were analysed for *P. aeruginosa* by culture (ISO 16266) and enzymatic detection (ED), and swabs from drains and aerators were analysed by culture. Copper and residual chlorine concentrations, temperature and flow rate were measured. *P. aeruginosa* concentrations were analyzed in four consecutive volumes of cold water and a lab-scale study was conducted on copper pipes and flexible hoses.

RESULTS. Drains were frequently contaminated by *P. aeruginosa* (51%) as opposed to aerators (1%) and water (culture: 4%, ED: 16%). Prevalence in water samples was comparable between electronic (16%) and manual (14%) faucets while higher for foot operated faucets (29%). Electronic faucets with manual temperature adjustment located on the faucet were less contaminated (14%) than those with a separate temperature control (31%), suggesting that architecture and mitigated volume influence *P. aeruginosa* growth. Concentration was 100X higher in the first 250mL than in the system. Flexible hoses were more favorable to *P. aeruginosa* growth than copper and temperature of 40°C led to higher counts.

CONCLUSIONS. The types of faucets and connecting pipes, flow rate and water quality are important parameters influencing the prevalence and the concentrations of *P. aeruginosa* in faucets. High concentrations of *P. aeruginosa* in the first 250mL suggest increased risk of exposure when using the first flush.

3.1 Introduction

The presence and amplification of opportunistic pathogens in drinking water distribution systems of healthcare facilities is a growing concern. *Pseudomonas aeruginosa* is a common cause of nosocomial infection and between 30% and 50% of hospital-acquired infections by *P. aeruginosa* in intensive care units would be associated with water (Exner, 2012). Electronically activated faucets (efaucets) have been increasingly installed to meet water conservation goals through lower maximum flow rates and shorter duration of flow. Non-touch water faucets are considered desirable to prevent healthcare contamination of workers in hospitals. A wide variety of faucet models that combine electronic activation and thermal mixing are available with varying degrees of complexity in their architecture and numerous internal materials, especially in complex efaucets (Moore & Walker, 2014; Walker et al., 2014).

Case studies have shown that efaucets are more susceptible to contamination by *P. aeruginosa* than manual faucets and that this increased susceptibility can lead to nosocomial outbreaks. A direct link between the contamination of faucets and clinical cases has been established by the correspondence between clinical and environmental strains sampled from electronic (Durojaiye et al., 2011; Ehrhardt et al., 2006; Walker et al., 2014; Yapicioglu et al., 2011) or manual (Blanc et al., 2004) faucets. Eleven peer reviewed studies report the impact of the type of faucets on the positivity and level of contamination by *P. aeruginosa* in water (Assadian et al., 2002; Berthelot et al., 2006; Chaberny & Gastmeier, 2004; Durojaiye et al., 2011; Halabi et al., 2001; Leprat et al., 2003; Merrer et al., 2005; Van der Mee-Marquet et al., 2005; Yapicioglu et al., 2011) and swab samples (Ehrhardt et al., 2006; Walker et al., 2014). Certain types of efaucet are more prone to contamination and more resistant to decontamination leaving their replacement by manual faucets as the only option to resolve contamination (Berthelot et al., 2006; Chaberny & Gastmeier, 2004; Durojaiye et al., 2011; Leprat et al., 2003; Van der Mee-Marquet et al., 2005). The greater susceptibility of efaucets to contamination has led to recommendations limiting the installation of efaucets and thermostatic mixing valves (TMVs) devices, including

recommendations to avoid certain device features and the obligation to conduct a risk assessment before installation (Health and Safety Executive (HSE), 2013; Institut national de santé publique du Québec (INSPQ) & Gouvernement du Québec, 2009).

Comparative measurements of faucets operated at laboratory and full scale show that the type of aerator, the use of flexible connectors and the presence of a separate mixing valve favor the growth of opportunistic pathogens in biofilm (Berthelot et al., 2006; Halabi et al., 2001; Walker et al., 2014). Other potential but not confirmed causes often cited include: low flow rate, flow regime, stagnation volumes in the device, the type of material within the faucet, temperature of stagnation volume, configuration of upflow connecting pipes and water usage pattern (Halabi et al., 2001; Merrer et al., 2005; Sydnor et al., 2012). Only one study didn't observe differences in contamination between faucet types and attributed the absence of increased contamination of efaucets to the short length of the connecting pipes (<25cm) (Assadian et al., 2002).

Studies comparing the level of contamination of efaucets are based on culture monitoring results. The presence of common environmental stressors in drinking water distribution systems can influence the culturability of *P. aeruginosa* and cause a large proportion of bacteria to enter a viable but non culturable (VBNC) state (Bédard et al., 2014; Dwidjosiswojo et al., 2011). Specifically, environmentally relevant concentrations of copper (63-250 µg Cu/L) and chlorine (0.5–2.0 mg Cl₂/L) can reduce the culturability by 3.5-6 Log (Bédard et al., 2014; Dwidjosiswojo et al., 2011; Xue et al., 2013).

Environmental conditions in premise plumbing vary depending on the stagnation conditions and the last meters before the faucet have been shown to be conducive to a significant increase of *Pseudomonas spp.* (Serrano-Suarez et al., 2013) and *P. aeruginosa* (Cristina et al., 2014; Department of Health (DH) et al., 2013; Flemming & Bendinger, 2014) detection. Thus, the volume flushed before sample collection and the volume sampled are critical.

The objectives of this study were to 1) determine whether efaucets are more or less colonized by *P. aeruginosa* than manual faucets, 2) assess the influence of connecting water pipes and environmental stressors (residual chlorine and copper) concentrations on faucet positivity and 3) locate the pipe sections most susceptible to the proliferation of *P. aeruginosa* within the cold water system.

3.2 Material and methods

Samples were collected from 210 faucets and drains in four healthcare centers in the province of Quebec (Canada) from April to August 2013. Sectors serving vulnerable patients were identified by the hospital infection control officer. Most efaucets sampled were of simple architecture and equipped with a manual temperature control lever (no TMVs). For each faucet, environmental samples were collected: 1) a swab from the drain, 2) 1L of first flush cold water in sterile propylene bottle with 1% sodium thiosulfate and 3) a swab of the aerator. Hot water temperature was measured after one minute flush, residual chlorine from the second liter, water flow rate and copper ion concentration from first flush (50mL) (resampled sites).

P. aeruginosa in water was detected by culture using ISO 16266:2006 (*International Organization for Standardization (ISO), 2006*) and by enzyme detection (ED) using the kit PseudalertTM. For culture, 10 mL and 100 mL were filtered on 0.45 µm cellulose membrane in duplicate. Filters and environmental swabs were placed on cetrimide agar with nalidixic acid (45.3g/L Cetrimide Selective Agar (Remel), 10mL/L glycerol (Fisher), 0.015g/L nalidix acid (Sigma-Aldrich)), incubated at 37.5°C for 48h and counted after 24h and 48h. Residual chlorine concentrations were measured with a Pocket Colorimeter II (HACH, USA). Total copper concentrations were measured by ICP-MS following EPA 200.8 method with prior acid digestion of 0.5% HNO₃ for 24h (United States Environmental Protection Agency (USEPA), 1994).

Lab-scale studies were conducted on two brands of 12.5 mm diameter certified (NSF61C) new braided flexible hoses and on 66cm of new copper pipes. A length of 50.8cm of Bélanger XCFC-420PP (ELAST#1) and 76.2cm of Überhauss JLS38C12-030 (ELAST#2) were used. Preconditioned capped flexible (30mL ELAST#1 and 45mL ELAST#2) and copper pipes (100mL) were then filled with sterile ultrapure phosphate buffered water (pH=7.3) spiked with a suspension of *P. aeruginosa* strain PA14 to obtain 10⁵ cells/mL.(Lee et al., 2006)

Statistical analyses were performed with Statistica10 (StatSoft). Non parametric Kruskal-Wallis, Fisher exact test, χ^2 test, t-test and multivariate adaptative regression (MARSpline) were used to analyse binomial, categorical and nominal variables.

3.3 Results

Table 3.1 shows the occurrence of *P. aeruginosa* in biofilm swabs and water samples sorted by healthcare centers. Rate of contamination was significantly higher for drains (108/210) than water (9/210) and aerators (3/210). In water, the occurrence of *P. aeruginosa* was also generally low but significantly higher with the ED method than the culture based method.

Tableau 3.1 Percentage (%) of positive samples for *P. aeruginosa* in biofilm swabs of drains and aerators by culture and in 100mL of water samples by culture and enzyme detection (* p<0.01)

Healthcare centers	Number of faucets (n=210)	Biofilm (swab)		Water	
		Drain	Aerator	Culture	Enzyme detection
		Culture	Culture		
1	68	65 %	1.5 %	3 %	9 %
2	60	40 %	1.7 %	5 %	15 %
3	52	60 %	1.9 %	4 %	31 %
4	30	27 %	0 %	7 %	10 %
Total all healthcare centers		51 %*	1 %*	4 %*	16 %*

Specific positivity rates of water samples for each type of faucets, connecting water pipes and physico-chemical parameters are presented in Table 3.2. Prevalence in water samples was comparable between electronic and manual faucets while slightly higher for foot operated faucets for both methods.

Tableau 3.2 Summary statistics per type of faucet, connecting water pipes and physico-chemical parameters for positive *P. aeruginosa* samples, where n_{TOT} represents the total number of samples, n^+ the number of positive samples and n_{TOT}^+ the total number of positive samples for a given category

Data collections	Samples (n_{TOT})	Culture			Enzyme detection		
		n^+	$\frac{n^+}{n_{TOT}}$ (%)	n_{TOT}^+ (%)	n^+	$\frac{n^+}{n_{TOT}}$ (%)	n_{TOT}^+ (%)
Type of faucets ($n_{TOT} = 210$)							
Electronic	105	5	5%		17	16%	
With faucet integrated T° control	92	5	5%	56%	13	14%	38%
With T° separate control on side of sink	13	0	0%	0%	4	31%	12%
Manual	90	2	2%	22%	13	14%	38%
Foot operated	14	2	14%	22%	4	29%	12%
In-wall push button	1	0	0%	0%	0	0%	
Connecting pipes ($n_{TOT} = 210$)							
Flexible hoses	118	5	4%	56%	17	14%	50%
Copper pipes	50	1	2%	11%	9	18%	26%
Flexible hoses and copper pipes	42	3	7%	33%	8	19%	24%
Temperature hot water (after 1 minute) ($n_{TOT} = 210$)							
$\geq 42^\circ\text{C}$	129	6	5%	67%	15	12%	44%
$< 42^\circ\text{C}$	81	3	4%	33%	19	23%	56%
Copper ($n_{TOT} = 134$)							
$\geq 250 \mu\text{g/L}$	113	5	4%	71%	21	19%	84%
$< 250 \mu\text{g/L}$	21	2	10%	29%	4	19%	16%
Chlorine ($n_{TOT} = 160$)							
$\geq 0.2 \text{ mg/L}$	66	4	6%	44%	8	12%	27%
$< 0.2 \text{ mg/L}$	95	5	5%	56%	22	23%	73%
Flow rates (efaucets, $n_{TOT}=86$)							
$\geq 5 \text{ L/minute}$	67	2	3%	40%	13	19%	76%
$< 5 \text{ L/minute}$	19	3	16%	60%	4	21%	24%
Drain ($n_{TOT} = 210$)							
Faucet with positive drain	108	4	4%	44%	14	13%	41%
Faucet with negative drain	102	5	5%	56%	20	20%	59%

As multiple factor scan affect both the response by culture and by enzymatic detection, a regression (MARSpline) was conducted on all available variables for all faucets combined (4 types) and for efaucets (2 types). Significant variables contributing to model response are shown on Table 3.3.

Tableau 3.3 Multivariate adaptative regression (MARSpline) results presenting significant variables for all faucets (4 types) and specifically for efaucets for either culture and/or enzyme detection as response variables

Input – Variables	Output		
	Response variable	Significant variables	R ²
All faucets - 4 types: manual, pedal, efaucet with local T control, efaucet with separate T control Aerator (\pm), drains (\pm) Temperature, residual Cl ₂ , Cu concentration, stagnation volume Connecting material type (3)	Enzymatic detection (MPN/100mL)	Temperature, aerator, connecting material, type of faucet, stagnation volume, Cu	0.42
	Culture (CFU/100mL)	Aerator, type of faucet	0.51
Efaucets - 2 types: with and without manual control Aerator (\pm), drains (\pm) Temperature, residual Cl ₂ , Cu concentration, stagnation volume Connecting material type (3) Flow rates	Enzymatic detection (MPN/100mL)	Cu, temperature, efaucet type	0.39

The impact of the connecting pipe's material was further investigated at benchscale by monitoring the persistence of *P. aeruginosa* in duplicate flexible hoses and copper pipes maintained at temperatures of 20, 40 and 55°C for 24h-48h-6days. Results are presented in Figure 3.1a for water samples (MPN/mL) and Figure 3.1b for biofilm samples (expressed as level of abundance). Depending on the type of material, suspended densities decreased, remained stable or increased at 40°C, while all materials but copper were colonized on swabs.

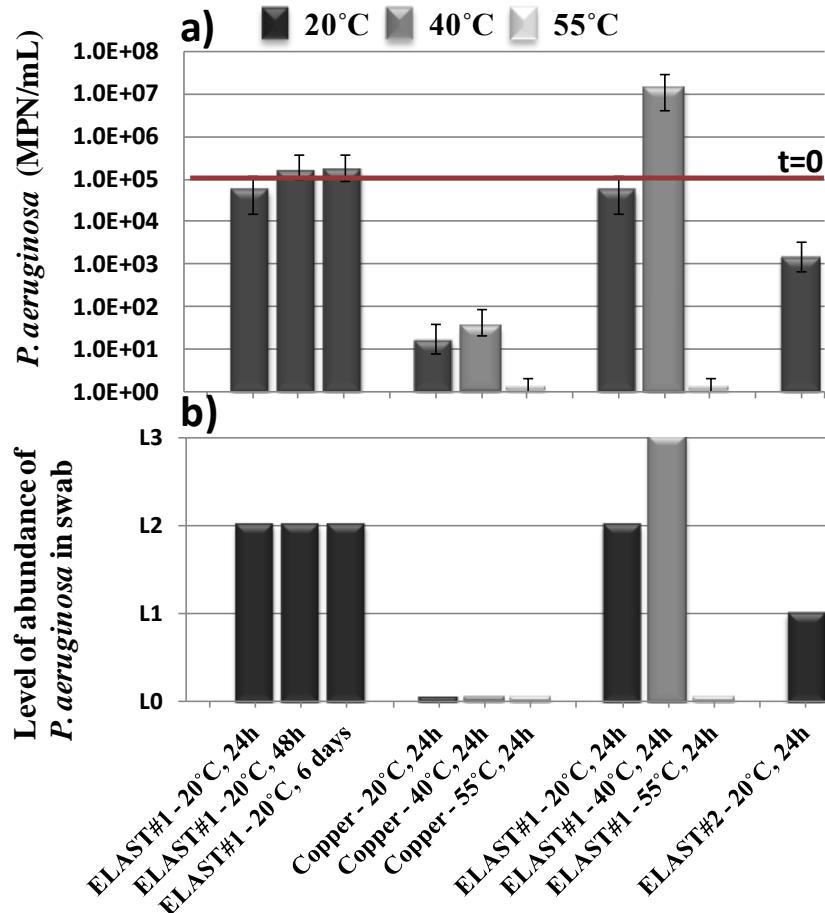


Figure 3.1 Mean *P. aeruginosa* (MPN/mL) by enzymatic detection in water (a) and by culture for swab samples (b), in flexible hoses (ELAST #1 and ELAST #2) and in copper pipe sections incubated at different temperatures for 24h to 6 days. Initial inoculum value of approximately 10⁵ MPN/mL indicated by red line. Swab sample results are expressed as relative abundance (L0=0 CFU/swab, L1=1-10 CFU/swab; L2=10-100 CFU/swab and L3= >100 CFU/swab). All values at 55°C were below detection level (BDL).

Figure 3.2 shows the mean copper and residual chlorine concentration for all sampling and for positive and negative samples for *P. aeruginosa* measured by culture and ED methods. Overall mean concentration of copper was 461 µg/L ± 212 (17-1,081 µg/L).

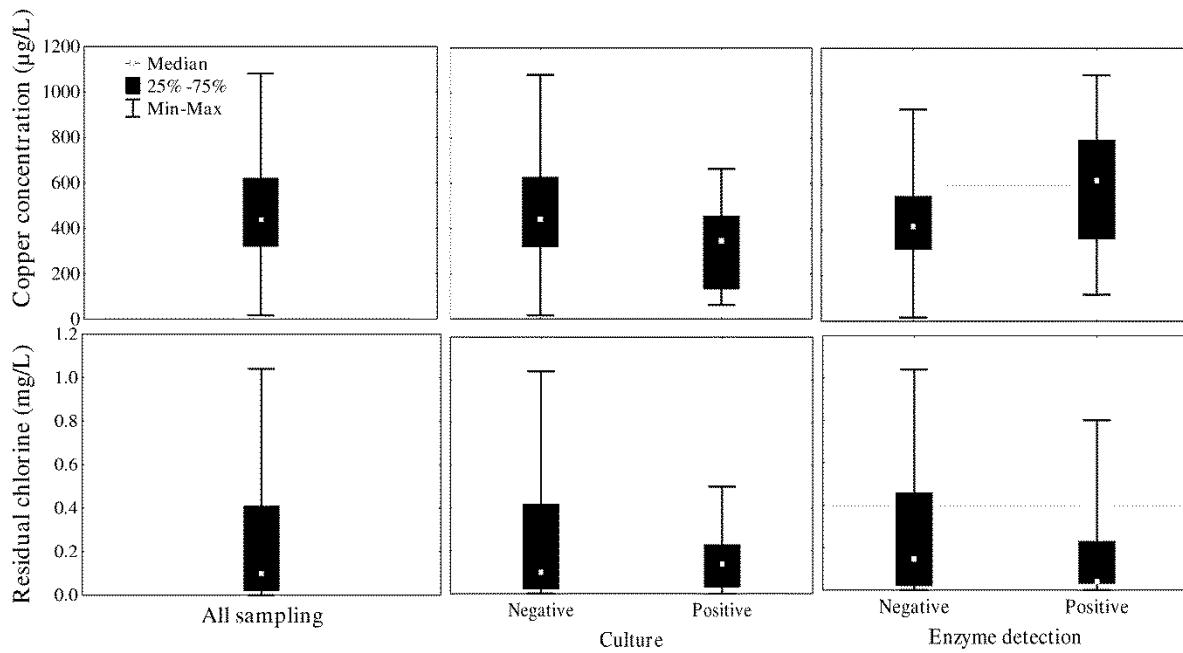


Figure 3.2 Mean copper ($n=160$) and residual chlorine ($n=134$) concentration for all sampling and for *P. aeruginosa* negative and positive samples with culture and enzymatic detection method.

Figure 3.3a shows concentration profiles of *P. aeruginosa* in volumes sampled sequentially in three faucets connected with flexible hoses. The first 25 mL sampled in the first flush had mean concentrations of 204 UFC/100mL as compared to 0.4 UFC/100mL in the distribution systems. Copper concentrations profiles showed substantial variations whether considering concentrations at a faucet ($77\text{-}463 \mu\text{g/L}$) or peak concentrations from first and second flush, with varying chlorine concentrations (Figure 3.3b).

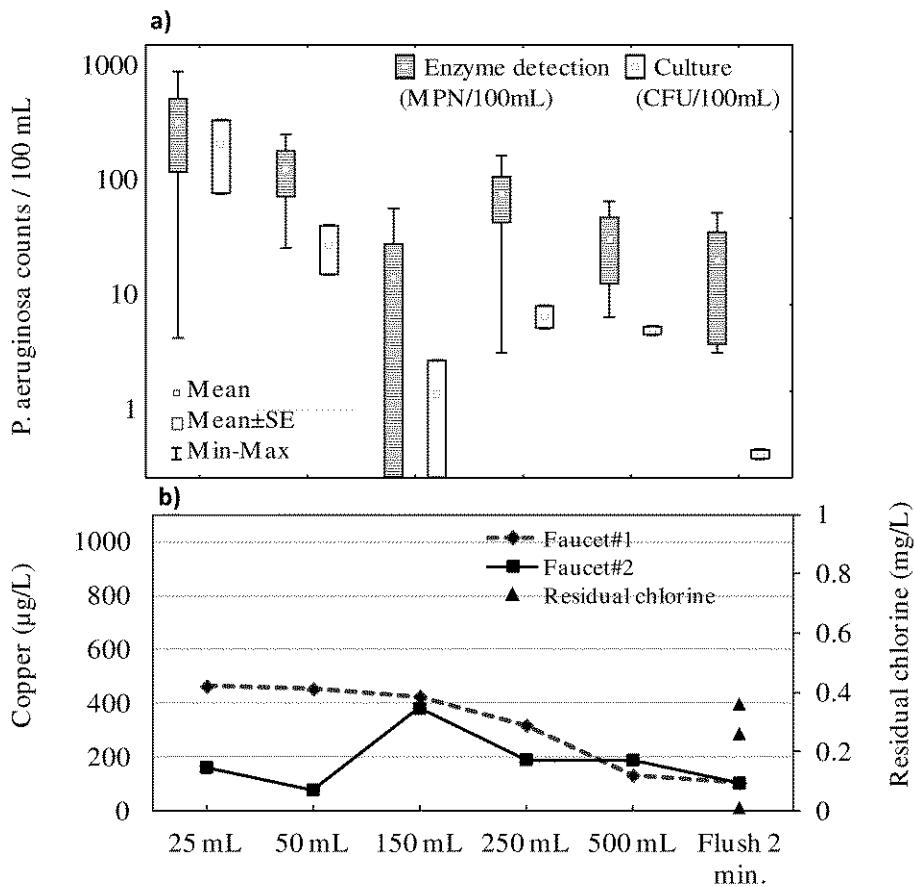


Figure 3.3 a) Presence of *P. aeruginosa* in water volumes taken in sequence (at three faucets) analyzed by culture (n=2) and by enzymatic detection (n=4); b) copper ($\mu\text{g/L}$ Cu) in water samples from sequential volumes and free chlorine concentrations ($\text{mg Cl}_2/\text{L}$) measured for each sampling event.

3.4 Discussion

Reported positivity rates in faucets for *P. aeruginosa* vary widely with prevalence often expressed as positivity in manual and efaucets ranging from 0-100% (Assadian et al., 2002; Berthelot et al., 2006; Chaberny & Gastmeier, 2004; Cholley et al., 2008; Cristina et al., 2014; Durojaiye et al., 2011; Ehrhardt et al., 2006; Ferroni et al., 1998; Halabi et al., 2001; Leprat et al., 2003; Merrer et al., 2005; Rogues et al., 2007; Van der Mee-Marquet et al., 2005; Walker et al., 2014; Yapicioglu et al., 2011). These wide differences reflect the complexity and lack of consistency in the monitoring approaches including: sample type (water or biofilm), sampling protocol (stagnation/flushing, sample volume, aerator, swabbing technique, detection method),

sampling plan (number and location of sampling sites, frequency, repeat sampling), system related determinants (system configuration, materials, type of devices, water quality) and sampling context (outbreak situation). Manual faucets are perceived to be less susceptible to *P. aeruginosa* contamination than efaucets, which include a wide range of devices electronically activated and using or not TMVs. Both types of faucets are exposed to other environmental factors affecting contamination such as chlorine and copper concentrations in water, types of faucet and connecting pipes materials and cross contamination from drains.

Impact of the types of faucets, aerator and plumbing connectors

A small proportion of water samples from manual faucets were positive for *P. aeruginosa* (2% by culture, 14% by ED). The observed positivity falls into the range of reported values for water samples in study with more than 25 faucets (1-18%) (Cholley et al., 2008; Ferroni et al., 1998; Merrer et al., 2005; Rogues et al., 2007) and faucets biofilm swabs (4-48%) (Blanc et al., 2004; Hota et al., 2009; Vianelli et al., 2006; Walker et al., 2014). In this study, water from efaucets not equipped with TMVs was not more frequently positive for *P. aeruginosa* than from manual faucets (16% vs 14%). Interestingly, when positive, water from manual faucets had higher concentrations (>300 CFU/100mL by culture, 2419 MPN/100mL by ED) than observed in efaucets (97.5 CFU/100mL by culture, 308 MPN/100mL by ED). In contrast, Walker et al. conducted a detailed assessment of surface contamination of 494 components from 30 faucets (25 sensor and 5 non sensor) and concluded that efaucets had a significantly higher odds ratio (3.8) than manual faucets when having at least one component positive for *P. aeruginosa* (Walker et al., 2014).

Water from efaucets equipped with a separate control on the side of the sink appeared more frequently positive (31%) than with a control directly integrated in the faucet (15 %) (Table 3.2). The main difference in design is the volume of mixed hot and cold water: about 10mL with a mixing chamber integrated to the faucet body, and 30ml if the control valve and flexible connecting pipe is located on the side of the sink. These findings agree with prior reports of lower bacterial loads in water for efaucets with manual temperature adjustment (7%) compared to those with a pre-set temperature and separate magnetic valve without any user control (74 %) (Halabi et al., 2001). Moreover, 29% of foot operated faucets were positive. The regression analysis of *P. aeruginosa* concentrations revealed that the mixed stagnant volume and the type of faucet were

significant contributors ($R^2=0.42$ for culture $R^2=0.51$ for ED). Prior reports suggest that greater susceptibility to contamination may be caused by lower flow rates in efaucets resulting in less efficient flushing. Measured flow rates were relatively high (5.8 ± 1.7 L/min) and well above current trends of reducing flow to less than 2 L/min for water conservation goals. Despite these high flow rates, operating personnel reported more frequent blockage of drains after sinks were retrofitted with efaucets. This observation might be a result of the lower water usage.

Our results show low level of colonization for swabs of the external surfaces of aerators which are most likely attributed to their simple structure. The type of aerator can also influence the contamination by *P. aeruginosa*. Walker and al. (2013) showed that complex flow straighteners accounted for 60% of all positive swabs from components of efaucets. Neoperl aerators susceptible to biofilm accumulation were more favorable to *P. aeruginosa* growth while simple plastic and metal aerators were not contaminated (Walker et al., 2014). Despite its low positivity, contamination of the aerator was a statistically significant variable predicting the concentration of *P. aeruginosa* in water by both methods (Table 3.3).

Connecting pipes material was found to be a significant contributor to the positivity and concentration of *P. aeruginosa* in water. Within positive samples, the percent of faucets connected with flexible hoses were 1.9 times (ED) to 5.1 times (culture) more positive than those connected with copper only pipes (Table 3.2). Copper piping was a significant contributor to concentrations detected by the ED method, but not by culture (Table 3.3). Some plastics connecting pipes such as polyethylene, polypropylene and ethylene-propylene can support bacterial development and favor *P. aeruginosa* biofilm development (Bressler et al., 2009; M.M. Moritz et al., 2010; Rogers et al., 1994b). This is coherent with findings by Walker et al. (2013) showing that flexible hoses were more frequently contaminated as opposed to for copper pipes (29% vs 5%) (Walker et al., 2014).

Physico-chemical parameters

Temperature and copper concentrations in water were significant contributors to the regression predicting the positivity and concentrations of *P. aeruginosa* by ED in water for all types of faucets (Table 3.3). When considering only results for the two types of efaucets, copper and temperature were the most significant contributors to the concentrations by ED (Table 3.3). Mean hot water temperatures after one minute of flow in faucets positive for *P. aeruginosa* were

slightly lower ($46.2^{\circ}\text{C} \pm 13.2$) than in negative faucets ($51.1^{\circ}\text{C} \pm 10.0$), and significantly ($p<0,0001$) higher in manual faucets ($55.0^{\circ}\text{C} \pm 7.6$) than in efaucets ($45.3^{\circ}\text{C} \pm 11.0$). The 10°C difference observed between efaucets and manual faucets can be explained by: (1) a permanent cold water flow to the mixing valve for efaucets as many of these faucets cannot mechanically exclude cold water completely; this was observed in some of the disassembled efaucets sampled; or (2) by mixing of hot and cold water supplies due to defective or obstructed backflow valves which was commonly reported by operators during field work. Relying on hot water supply temperature (65°C) and high distal temperatures at faucets with mixing valves ($50\text{-}58^{\circ}\text{C}$) was not efficient to lower positivity of concentration of biofilm from mixing chambers (Petignat et al., 2006), most probably because of the lower temperatures of water in the mixing TMV chamber. Bench scale results on materials show the importance of maintaining 55°C to control suspended and fixed *P. aeruginosa*. Controlled pasteurization of faucets can be effective if faucets are flushed at 70°C for 30 minutes as shown by the eradication of *P. aeruginosa* from 87 non-touch faucets, only possible by disconnecting cold water (Van der Mee-Marquet et al., 2005) or by more stringent thermal flushing at 75°C for 60 minutes (Spinks et al., 2006). Measured temperature in our institutions exceeded the ideal *P. aeruginosa* growth temperature upper limit of 42°C but clearly fell short of effective thermal inactivation conditions (Brown, 1957).

Our findings suggest that environmental factors such as copper concentrations and hot water temperature will influence the persistence and detection of *P. aeruginosa* in all types of faucets, but especially so in efaucets. This highlights the importance of selecting efaucets that are designed to sustain high temperature flushing and that minimize the mixing chamber stagnant volume. However, higher hot water systems temperature cannot ensure thermal inactivation conditions sufficient to control distal growth of *P. aeruginosa* if efaucets have significant stagnant volumes in mixing chambers.

The impact of copper concentrations on detection of *P. aeruginosa* followed opposite trends for culture and ED methods. It is noteworthy that significantly more positive water samples were detected with the ED method than by culture. The presence of elevated copper ion concentrations may affect the enzymatic response while it inhibits growth on culture media. The correlation between culture and ED results is significantly altered in presence of $63.5\text{-}250 \mu\text{g/L}$ copper (Bédard et al., 2014; M. M. Moritz, 2011).

The absence of any significant impact of chlorine residual was not surprising considering the demonstrated survival of resistant *P. aeruginosa* to 0.5 mg/L Cl₂ after 30 minutes (Shrivastava et al., 2004), the relatively low concentration only found in cold water (0.23 mg /L ± 0.27) and the absence of chlorine residual in hot water, and previous demonstrations of the inefficiency of low dosage chlorine disinfection (Berthelot et al., 2006; Ferroni et al., 1998; Van der Mee-Marquet et al., 2005).

Sequential sampling

Proliferation of opportunistic pathogens can be systemic within a building's water distribution system or localized at the point of use (distal). In the present study, *P. aeruginosa* contamination was significantly and systematically more important near the point of use, in the water from the faucet or its plumbing connection. Results from previous studies analysing first flush and post flush samples for *P. aeruginosa* and for *Pseudomonas spp.* also suggest the first liter as ideal to detect contamination (Cristina et al., 2014; Serrano-Suarez et al., 2013), with *P. aeruginosa* mean concentrations of 4.7 CFU/100mL in the first liter reduced by 7 fold after flushing. In this study, the first 25 mL and 50 mL volumes were more concentrated in *P. aeruginosa*, 535 and 16 times more by culture and 72 and 6 times by ED. The steep concentration gradient as a function of flushing revealed by the detailed concentration profiling demonstrates that the volume of sample is critical to assess the level of contamination. Indeed, our weighted average concentrations in the first liters were similar at 11 CFU/100mL and 51 MPN/100mL, masking the higher contamination in the first volume (25mL) by factors of 9 (culture) and 6 (ED). The third volume of sequential sampling (75-225mL) corresponds to the distal final piping section in which water stagnates between uses. Lower *P. aeruginosa* concentrations observed in this section could be caused by the absence of biofilm on the connecting copper pipe exposed to low nutrient and oxygen and copper ions. Finally, a significant concentration of *P. aeruginosa* remains after flushing when using ED, suggesting lower but sustained systemic contamination, possibly by VBNC *P. aeruginosa*.

The results of this study reveal that simple design efaucets with temperature control integrated in the faucet body were not more susceptible to *P. aeruginosa* contamination than manual faucets in four healthcare facilities. Multivariate regression models showed that a positive aerator, hot water temperature, copper concentrations, mixed stagnation volume and the type of faucets and

material are significant contributors to the prediction of *P. aeruginosa* in water. Our findings also indicate that higher levels and positivity for *P. aeruginosa* will be detected when using an ED method as compared to the reference culture method. The presence and significance of VBNC *P. aeruginosa* should be addressed in future research as environmental stressors that induce the VBNC state are commonly present in premise plumbing.

The importance of documenting all parameters is highlighted in this study by the large number of variables contributing to the contamination of water in faucets. Furthermore, the demonstration of a higher contamination of the first 250mL of water has practical implications with sampling protocols and raises a significant clinical issue with efaucets, as they are not designed to flush the first volume when using water. Healthcare workers will systematically expose their hands to this volume when activating the flow. This raises the importance to evaluate the impact of water saving measures on the water quality and bacterial exposure for vulnerable patients.

Acknowledgements

This research was supported by the NSERC Industrial Chair on Drinking Water and its partners. The authors would like to acknowledge the contribution of the staff of the NSERC Chair.

CHAPITRE 4 ASPECTS MÉTHODOLOGIQUES ET RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES À L'ARTICLE

Ce chapitre est consacré aux résultats ne pouvant faire partie de l'article, mais présentant des aspects intéressants. Par ailleurs, plusieurs des résultats complémentaires suivants ont été présentés dans le rapport distribué aux hôpitaux participant au projet de recherche. La contamination selon les marques de robinet, les niveaux de *P. aeruginosa* observés dans l'eau et le biofilm ainsi que les concentrations moyennes au premier jet et dans le système sont présentés. De plus, la dernière partie approfondit sur la comparaison des deux méthodes de quantification de *P. aeruginosa*, le dernier objectif du mémoire. Les différences de prévalence et de concentration entre les deux méthodes lors de l'échantillonnage et l'influence du chlore et du cuivre sont analysés.

4.1 Contamination selon les marques de robinet

Un total de 105 robinets électroniques, 90 robinets conventionnels et 14 robinets à pédales, de plusieurs marques différentes ont été échantillonnées. Le tableau 4.1 présente les statistiques de contamination par marque de robinets. Il est difficile d'identifier des modèles ou marques problématiques étant donné le faible nombre de robinets analysés du même type, et le nombre encore plus faible de robinets contaminés.

Quoique les spécificités de certains modèles, par exemple la présence d'une chambre de mélange ou l'utilisation de matériaux propices au développement du biofilm, soient des aspects importants, il faut aussi considérer l'ensemble des conditions environnementales auxquelles sont soumis les robinets pour expliquer la contamination.

Certaines particularités techniques sont dignes de mention. La marque de robinet Hansa était la plus souvent employée dans les établissements de santé visités; les modèles Cobra et le Mix étant les plus installés. Les robinets électroniques Hansa échantillonnés étaient tous munis d'un ajustement manuel de la température à la base du robinet. Lors de l'échantillonnage, plusieurs exploitants ont mentionné les bris fréquents au niveau des clapets anti retour de l'eau chaude et froide de ces modèles. Leur activation était toutefois rapide, l'écoulement abondant et le débit moyen mesuré était de 5,5 litres/minute. Les robinets électroniques de la marque Zurn étaient ceux qui prenaient le plus de temps avant d'obtenir un écoulement d'eau. Le débit moyen de

l'ensemble des robinets électroniques était de $5,8 \pm 2,2$ litres/minute avec des valeurs s'étendant de 3,4 à 12 litres/minute.

Tableau 4.1 Contamination selon les marques des robinets et selon les types de robinets

Robinets électroniques contaminés (n=105)	
Aquanar	0% (0/3)
Chicago	29% (2/7)
Geberit	0% (0/14)
Hansa	22% (14/64)
Sloan	22% (2/9)
Zurn	40% (2/5)
Autres	0% (0/3)
Robinets conventionnels contaminés (n=90)	
American Standard	0% (0/3)
Crane	14% (4/29)
Delta	0% (0/4)
Hansa	38% (3/8)
Moen	0% (0/2)
Powers	0% (0/15)
Teck	0% (0/7)
Zurn	17% (1/6)
Autres	31% (5/16)
Robinets à pédales (n=14)	
Chicago	0% (0/1)
Crane	0% (0/5)
Zurn	60% (3/5)
Autres	33% (1/3)

4.2 Niveaux de contamination de *P. aeruginosa*

4.2.1 Dans l'eau

Les niveaux de contamination de *P. aeruginosa* recensés dans l'eau, selon les types de robinet, sont très différents d'une étude à l'autre, varient entre 8 UFC/ 100mL et plus de 300 UFC/

100mL (Berthelot et al., 2006; Durojaiye et al., 2011; Halabi et al., 2001; Merrer et al., 2005). Le tableau 4.2 présente les niveaux observés dans l'eau de ces quelques études en comparaison avec nos résultats.

Notons qu'un faible nombre d'analyses influence énormément l'interprétation des valeurs, particulièrement la moyenne. De plus, les limites de quantification de la culture ont varié de 1 UFC/100mL à plus de 300 UFC/100mL. Un des robinets conventionnels que nous avons échantillonné présentait un très important niveau de contamination, augmentant de beaucoup la moyenne de *P. aeruginosa* pour ce type de robinet. Dans les autres études, ce sont les robinets électroniques qui obtiennent des niveaux de *P. aeruginosa* plus élevés.

Tableau 4.2 Concentrations de *P. aeruginosa* dans l'eau rapportées et observées durant cette étude

Niveaux de <i>P. aeruginosa</i> dans l'eau	Auteur	Moyenne <i>P. aeruginosa</i> (UFC/ 100 mL)	Types de robinet	Nb. de robinets contaminés
Cette étude		30 (2-97,5)	RE	5
		151 (1-300)	RC	2
(Merrer et al., 2005)		Entre 8 et 100	Majorité de RE	27
		>100	Majorité de RE	11
(Halabi et al., 2001)		50	RE	10
(Berthelot et al., 2006)		50	RE	1 (3 analyses)
		< 1	RC	1
(Durojaiye et al., 2011)		> 300	RE	10

4.2.1 Dans le biofilm

Seule l'étude de Walker et al. (2014) compare des niveaux de *P. aeruginosa* dans le biofilm selon les types de robinet et types de raccordement de plomberie. Les niveaux observés sont plus élevés dans les composantes des robinets électroniques et dans les conduites tressées flexibles, tel que présenté à la figure 4.2 (Walker et al., 2014). Nos résultats de laboratoire décrits au Chapitre 3 et présentés à la figure 3.1 selon une échelle d'abondance relative suggèrent une même tendance quant aux types de raccordement.

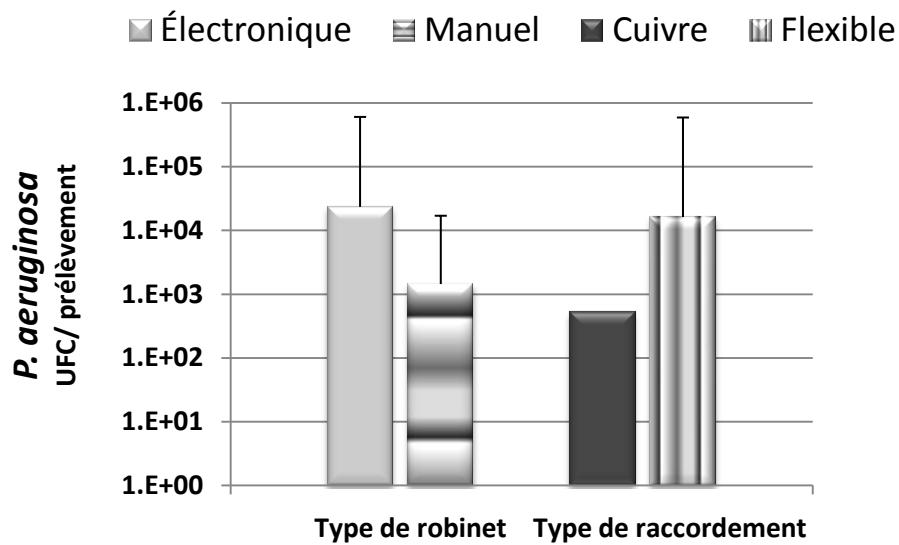


Figure 4.1 Niveaux de *P. aeruginosa* dans le biofilm, selon les types de robinet et types de raccordement de plomberie (Walker et al., 2014).

4.3 Concentration de *P. aeruginosa* dans l'eau au premier jet et dans le système

Des mesures séquentielles des concentrations de *P. aeruginosa* ont démontré la présence de faibles concentrations dans l'eau du réseau d'eau froide et une amplification de cette présence au niveau distal, c'est-à-dire au robinet et dans sa plomberie de raccordement, dans les établissements de cette étude (données publiées dans l'article). En effet, les concentrations moyennes de *P. aeruginosa* étaient beaucoup plus élevées (204 UFC/100mL en culture) dans les premiers 25 mL après ouverture du robinet, contrairement à celles dans le réseau, après un écoulement de l'eau de 2 minutes (0,4 UFC/100mL en culture). La figure 4.3 compare les concentrations moyennes de *P. aeruginosa* obtenues à celles présentées dans l'étude de Cristina et al. (2014), dans le premier jet et dans un échantillon après 2 minutes de rinçage, soit environ après 13 litres d'écoulement considérant un débit moyen de 6 L/minute.

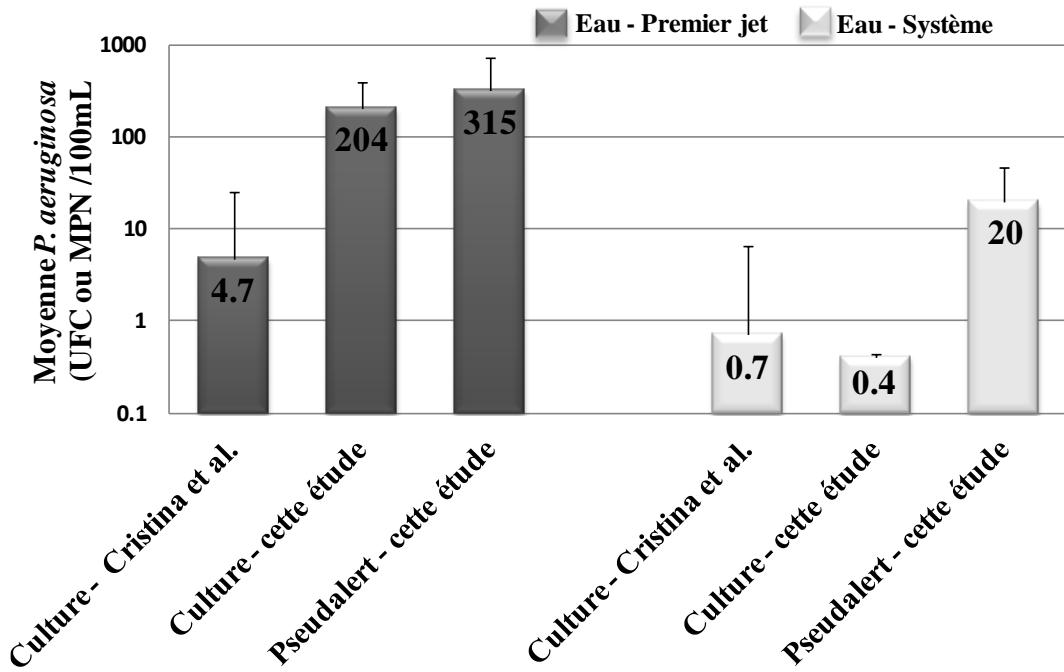


Figure 4.2 Moyenne \pm écart-type des concentrations de *P. aeruginosa* dans l'eau du premier jet et après rinçage (système) observés pendant l'étude de Cristina et al. (2014) et cette étude.

Toutefois, tel que discuté au Chapitre 3, les volumes d'échantillonnage influencent grandement cette comparaison. Dans le cas des résultats de Cristina et al. (2014), un volume d'un litre était prélevé. Dans le cas de notre étude, un échantillon de 25 mL était prélevé au premier jet. Pour des volumes égaux d'un litre, les niveaux observés par culture sont tout à fait comparables.

4.4 Comparaison entre les deux méthodes de quantification de *P. aeruginosa*

Tout d'abord, une comparaison des deux méthodes a été réalisée lors des essais contrôlés au laboratoire. Les concentrations de *P. aeruginosa* ont été mesurées pour les deux méthodes, en présence de chlore et en présence de cuivre, en fonction des temps de contact et de stagnation. L'essentiel des résultats de ces essais ont été publiés dans l'article présenté à l'annexe 1. En complément, il est intéressant de comparer les résultats des prévalences et des concentrations de *P. aeruginosa* de la campagne d'échantillonnage par ces deux méthodes, en tenant compte également de l'influence du chlore et du cuivre.

4.4.1 Différence de prévalence et de concentration entre les deux méthodes

Les deux méthodes de détection, qui ont été utilisées afin de quantifier les densités de *P. aeruginosa*, se démarquent par rapport à la fréquence de détection, mais aussi par les concentrations mesurées.

Tout d'abord, rappelons que les fréquences de détection pour un même volume analysé, présentée dans l'article au chapitre 3 était significativement plus élevées avec la méthode de détection enzymatique, 16 %, par rapport à 4 % pour la culture. On remarque qu'en plus du nombre de positifs plus élevé, les concentrations détectées sont aussi plus élevées. La figure 4.4 montre les concentrations mesurées par les deux méthodes pour tous les échantillons positifs d'eau.

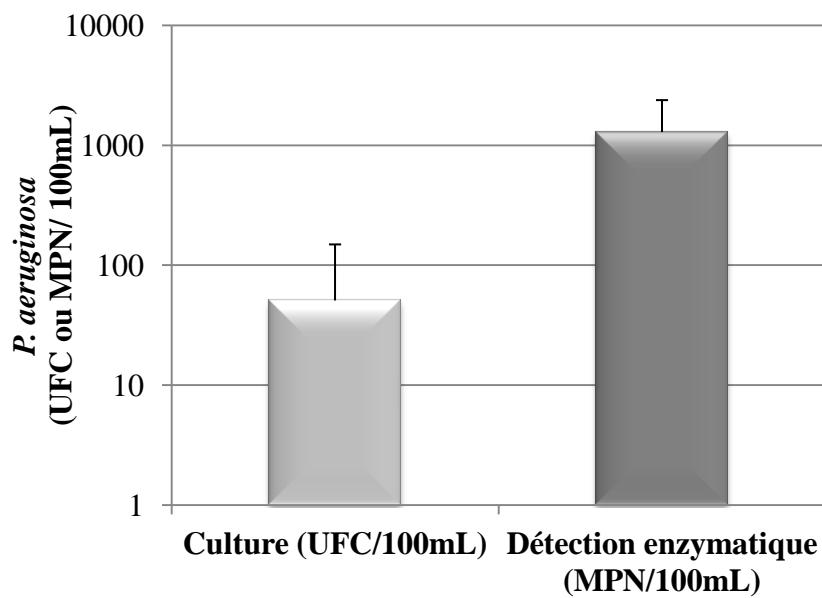


Figure 4.3 Concentrations moyenne (\pm écart-type) de *P. aeruginosa* dans les échantillons positifs mesurés par culture et par détection enzymatique (nombre de positifs : n=34 par méthode enzymatique et n=9 par culture).

Il est important de souligner que les résultats au premier jet par culture et encore plus par détection enzymatique sont élevés si on les compare aux valeurs recommandées en milieu hospitalier. Des valeurs seuils ont été proposées pour les usages en milieu hospitalier, la plupart sous 1 UFC/100mL (République Française & Ministère de la Santé et des Solidarités, 2005). Au Royaume-Uni, la valeur recommandée pour la majorité des soins est de <1 UFC /100mL et le

niveau d'action de 10 UFC/100mL (Department of Health (DH) et al., 2013). Après écoulement, les valeurs moyennes sont sous ces valeurs seuils. À noter que ces seuils s'appliquent à l'eau utilisée pour les soins et non pas à l'eau de tous les robinets dans une institution. Toutefois, les résultats montrent bien que le 1^{er} litre, et encore plus les premiers 250mL, dépassent considérablement ces niveaux. Il apparaît donc important d'éviter d'utiliser l'eau du premier jet pour tout type de soins. De plus, il est clair que l'utilisation de la méthode enzymatique augmenterait considérablement le nombre de sites dépassant le seuil de 10 UFC/100mL.

Les résultats obtenus avec la méthode de détection enzymatique étant beaucoup plus élevés que ceux par culture, on peut se demander s'ils peuvent être interprétés en référence aux mêmes valeurs seuils. Contrairement aux limitations des mesures par qPCR, la détection enzymatique utilisée durant nos essais ne détecte pas les bactéries mortes, mais une plus grande fraction des bactéries viables, dont une partie des bactéries viables non cultivables (Bédard et al., 2014). Ces deux méthodes diffèrent aussi dans leur méthode d'estimation, la méthode enzymatique étant une méthode probabiliste du nombre le plus probable. Par analogie, un développement similaire a été effectué pour la détection des coliformes fécaux et d'*E. coli* en contrôle sanitaire des eaux potables. Les tests enzymatiques de type Colilert ont été accrédités et ont quasiment remplacé la détection par culture avec membrane filtrante sans que soient modifiés les seuils de référence.

4.4.2 Influence du chlore et du cuivre sur les deux méthodes

4.4.2.1 Influence du chlore sur les deux méthodes

La concentration de chlore résiduel qui est mesurée au deuxième litre n'est pas nécessairement représentative de la concentration que l'on retrouve au premier jet après stagnation. Il n'y a généralement pas de chlore résiduel présent dans l'eau après une stagnation car le chlore est consommé par les matières organiques dans l'eau et les substances réductrices présentes à la surface des conduites. La figure 4.4 confirme qu'il n'y a pas de corrélation entre les dénombremens par culture et par détection enzymatique et les concentrations de chlore résiduel mesurées au deuxième litre lors de la campagne d'échantillonnage.

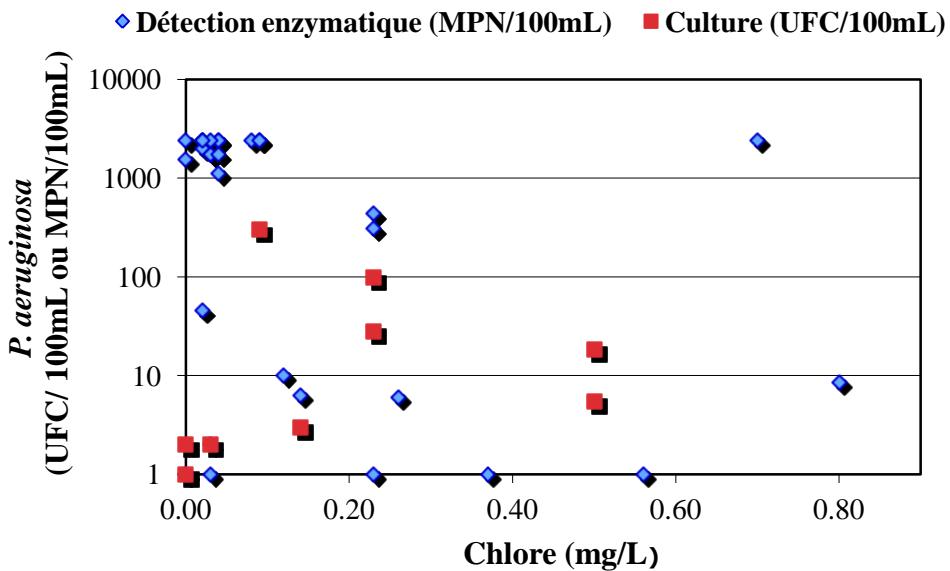


Figure 4.4 Concentrations de *P. aeruginosa* en fonction de la concentration de chlore résiduel dans le deuxième litre d'eau froide.

4.4.2.2 Influence du cuivre sur les deux méthodes

Des valeurs élevées de *P. aeruginosa* sont observées avec la méthode de détection enzymatique lorsque la concentration en cuivre est importante, tandis qu'il n'y a aucun positif en culture au-delà de 665 µg/L de cuivre, tel que présenté à la figure 4.5. Il est possible que cette différence s'explique par l'effet du cuivre, soit une stimulation de la réponse enzymatique et une inhibition de la croissance sur gélose. Les bactéries exposées au cuivre deviennent viables, mais non cultivables (VBNC) en présence d'une concentration élevée de ce métal (Bédard et al., 2014; Dwidjosiswojo et al., 2011). Avec la méthode enzymatique, le réactif servant de substrat sera clivé par une enzyme et produira une fluorescence. Le substrat cible probablement une exoenzyme, dont l'activité pourrait être amplifiée en présence de cuivre. Des tests supplémentaires devraient être réalisés au laboratoire afin de confirmer cette hypothèse. En résumé, certains points échantillonnés présenteraient des niveaux de *P. aeruginosa* plus élevés que la réalité.

Lors de la lecture des résultats avec la méthode de détection enzymatique, certaines plaquettes présentaient un nombre élevé de godets à faible fluorescence, menant à une incertitude quant à la positivité de *P. aeruginosa*. Ces mêmes plaquettes ont été associées aux robinets présentant des concentrations de cuivre élevée. Une récente étude a confirmé la présence de *P. aeruginosa* dans

97% des cas où les plaquettes présentaient une faible fluorescence (Semproni et al., 2014), éliminant ainsi l'incertitude et laissant toujours présager une influence du cuivre sur la méthode.

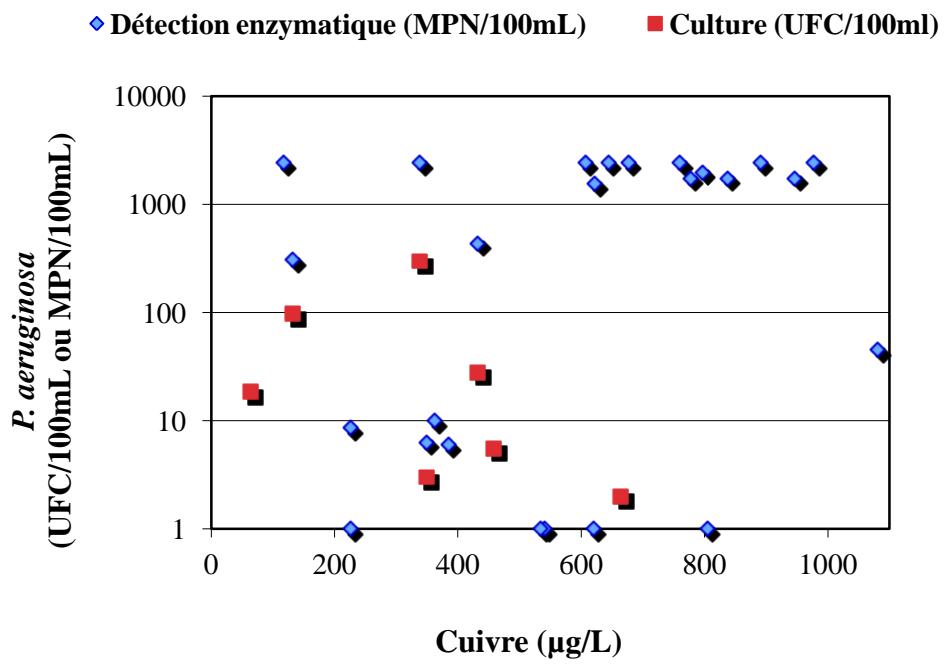


Figure 4.5 Concentrations de *P. aeruginosa* en fonction de la concentration de cuivre mesurée au premier jet.

CHAPITRE 5 DISCUSSION

Ce chapitre présente une discussion générale sur les disparités dans les méthodes d'échantillonnage, une évaluation des coûts entre les deux méthodes de quantification, des pistes de compromis concernant les préoccupations sur l'eau entourant les milieux hospitaliers et les limites de l'étude.

5.1 Disparités dans les méthodes d'échantillonnage

Les études de prévalence de *P. aeruginosa* ou *L. pneumophila* dans les établissements de santé présentent un bon nombre de disparités quant au contexte et aux méthodes d'échantillonnage.

Par rapport au contexte, les investigations peuvent avoir eu lieu suite à la réouverture d'une section de l'hôpital, suite à une nouvelle construction, pendant une éclosion ou simplement pour effectuer un suivi de routine. Certaines études seront réalisées dans des unités de soins à risque contrairement à d'autres où des unités de soins spécifiques seront ciblées. Peu de détails sont également disponibles quant au type d'eau alimentant les établissements de santé ou si la tuyauterie de l'hôpital est entièrement en cuivre ou en plastique, dans le cas d'hôpitaux récents.

Dans les méthodologies employées, un nombre important de facteurs peut influencer les résultats et rendre la comparaison des études difficiles. L'échantillonnage de l'eau versus le biofilm, le nombre de sites échantillonnés, les analyses répétées au même point, les volumes d'eau amassés, les bactéries ciblées, les méthodes d'analyses au laboratoire, la présence d'un aérateur ou non, la désinfection préalable du robinet sont autant de facteurs différenciant les études entre elles. Par ailleurs, lors de l'échantillonnage, les résultats obtenus n'auront pas la même signification si le volume d'eau est pris dès le premier jet ou après un rinçage; représentant alors la contamination au robinet et la plomberie de connexion ou le système de distribution. Par conséquent, une comparaison valide entre ces études devient très difficile, et il faut rechercher des études suffisamment similaires.

5.2 Coût des deux méthodes de quantification de *P. aeruginosa*

Il est pertinent de compléter une comparaison entre les deux méthodes pour voir si la détection enzymatique pourrait éventuellement remplacer la culture pour effectuer les suivis de *P. aeruginosa* dans les établissements de santé.

Afin de compléter des analyses par culture, plusieurs milieux de culture sont requis. Le cétrimide avec de l'acide nalidixique pour effectuer les analyses et les milieux acétamide et King B selon que des tests de confirmation soient requis ou non, jusqu'à trois tests supplémentaires peuvent être nécessaire selon les types de colonies obtenues. Ces milieux de culture doivent être préparés à l'avance et nécessitent une utilisation planifiée puisqu'ils ont des dates d'expiration, soit d'un mois pour le cétrimide et l'acétamide et trois mois pour le King B. La préparation de ces milieux requiert un temps élevé au laboratoire puisqu'un protocole bien précis doit être suivi et les milieux sont stérilisés. En comparaison avec la détection enzymatique, la culture coûte plus cher pour ce qui est du matériel à cause des multiples milieux de culture requis, en tenant compte que l'équipement de base d'un laboratoire est disponible.

Au niveau de la main d'œuvre, tout est à l'avantage de la détection enzymatique. Aucun temps n'est requis pour la préparation ou pour des tests de confirmation et le temps nécessaire pour compléter les analyses est restreint. Les manipulations sont très simples; il suffit de dissoudre la poudre dans un contenant stérile avec un volume d'échantillon et d'y ajouter un volume d'eau pour ensuite transférer le tout dans le gabarit et passer dans la scelleuse. Il en va autrement avec la culture, avec des temps élevés nécessaires afin de compléter les préparatifs et les manipulations. Celles-ci requièrent beaucoup de précision et de minutie lors de la conception des milieux et pour couler les géloses, pour effectuer les filtrations et pour dénombrer les bactéries.

Un des coûts à considérer pour la méthode par détection enzymatique est l'achat de la scelleuse qui est non négligeable (environ 3000\$), mais qui trouve rapidement sa rentabilité. En comparaison, la rampe de filtration pour mettre en culture coûte un peu moins de la moitié.

En termes d'efficacité, les résultats sont disponibles après 24h pour le Pseudalert, tandis qu'ils le sont officiellement après 48 h avec la culture. Le compte des colonies doit être fait à 24h et 48 h. Également, comme nous l'avons vu dans notre étude, les taux de réponse sont meilleurs avec la détection enzymatique. Le tableau 5.1 résume les éléments de comparaison entre les deux méthodes de quantification de *P. aeruginosa*.

Tableau 5.1 Comparatif entre la culture et la détection enzymatique

Éléments comparés	Culture	Détection enzymatique
Matériel	Coût ↑	Coût ↓
Milieux de culture	Plusieurs	Aucun (sachet de poudre)
Main d'œuvre	Coût ↑	Coût ↓
Temps de préparation	Élevé	Aucun
Temps lors des analyses	Élevé	Modéré
Temps test de confirmation	Modéré à élevé	Aucun
Difficulté des manipulations	Modérée à difficile (minutie, précision)	Faible à modérée
Investissement initial	Coût ↓	Coût ↑
Résultats	24h – 48 h	24h
Taux de réponse	↓	↑

Il n'y a qu'un seul point contre la méthode enzymatique, tous les autres éléments sont en faveur de cette méthode. Il pourrait donc être envisagé dans un futur rapproché de faire une transition de la culture vers la détection enzymatique pour gagner du temps, de l'argent et obtenir des résultats d'analyses fiables en peu de temps. La compagnie travaille sur le développement d'un produit pour la détection de *L. pneumophila*, qui est encore plus complexe en termes de culture comparativement au *P. aeruginosa*. Le développement de méthodes d'analyses plus rapides et efficaces pourrait rendre le suivi de ces bactéries plus accessible dans les établissements de santé.

et pourrait être intégrer dans une démarche de contrôler du risque Water Safety Plan (World Health Organization (WHO), 2005).

5.3 Compromis entre les préoccupations environnementales et économiques et les préoccupations pour préserver la santé des usagers

Un écart existe entre les décisions qui seront prises par rapport aux préoccupations économiques et environnementales et celles prises afin de répondre aux besoins de préservation de la santé des usagers dans les milieux hospitaliers, notamment en ce qui a trait à la gestion de l'eau et le choix des dispositifs d'utilisation de l'eau. Certains développements technologiques visent à répondre à des objectifs de réduction de consommation d'eau. Toutefois, l'impact de ce type de dispositifs sur la qualité de l'eau n'est pas documenté. Les responsables de la prévention des infections sont responsables d'identifier les lacunes et d'assurer la protection des usagers contre les infections nosocomiales. Le défi est d'autant plus imposant face au vieillissement de la population et l'avancement des technologies qui impose au régime de la santé une clientèle de plus en plus vulnérable. C'est pour cette raison qu'il convient de proposer des compromis qui répondent à la fois aux directives gouvernementales de réduction et d'économie d'eau, mais ralliant les principales préoccupations.

Par l'installation de robinets électroniques, on souhaite diminuer les temps d'écoulement et les débits pour ultimement réaliser des économies d'eau potable et éviter le gaspillage de la ressource. Par contre, d'un point de vue santé, la réduction des débits ou du temps de rinçage nuit à la bonne circulation de l'eau et diminue la qualité microbiologique de l'eau. Également, puisqu'il a été montré que le premier jet est beaucoup plus contaminé, il faudrait limiter son utilisation. Il serait donc approprié de choisir des robinets électroniques ayant un volume mitigé minimal (<10ml), d'allonger le temps d'écoulement s'il est fixé ou mieux encore d'éviter de fixer un temps minimal d'écoulement. Aussi, il serait souhaitable de pouvoir faire couler l'eau entre vingt et trente secondes, selon le débit, avant de l'utiliser sans être en contact avec l'eau du premier jet. Cette mesure n'est pas évidente avec les robinets électroniques. Certains modèles de robinets électroniques proposent des dispositifs de rinçage automatisés. Quoiqu'intéressante à première vue, l'ajout de tels dispositifs augmentera encore plus le coût, la complexité des robinets et leur susceptibilité à des mal-fonctions ou des bris.

Les aérateurs et les robinets et douches à débit réduit diminuent les quantités d'eau de façon considérable lors de chaque utilisation, ce qui est souhaité pour répondre aux préoccupations de gestion plus efficace de l'eau. D'un point de vue santé, les aérateurs ont été identifiés comme un facteur majeur favorisant la contamination de l'eau par *P. aeruginosa*, particulièrement les aérateurs complexes qui visent à mieux distribuer un petit volume d'eau. De plus, ils favorisent la formation d'aérosols, pouvant faciliter l'inhalation et causer des infections nosocomiales. Les dispositifs à débit réduit ne permettent pas de rinçages fréquents et efficaces nécessaires à l'élimination des bactéries libres et à l'érosion du biofilm. Il faudrait donc évaluer si certains aérateurs pourraient être tolérés en évaluant les risques et le potentiel d'aérosols, en prohibant évidemment les dispositifs trop complexes favorisant l'établissement d'un biofilm. Finalement, il faudrait définir un débit minimal acceptable pour réaliser des économies d'eau, mais permettant de rincer adéquatement et efficacement les points d'utilisation. Un débit de 5 L/ minute pourrait être un débit acceptable dans les robinets. Il faudrait également évaluer s'il en vaut la peine de départager les zones avec des patients à risque et les toilettes publiques. Le tableau 5.2 présente le bilan des compromis proposés selon les différentes préoccupations.

Les compromis proposés pourraient, dans un avenir rapproché, être mis en application dans les nombreux hôpitaux en rénovation et en construction. Il faudrait d'abord et avant tout que les ingénieurs de projet consultent les spécialistes en prévention des infections et comprennent les enjeux concernant l'eau potable et la transmission des infections.

Tableau 5.2 Compromis face à la gestion de l'eau et aux choix de dispositifs dans les établissements de santé

Préoccupations environnementales et économiques	COMPROMIS	Préoccupations pour la protection de la santé
↓ Temps d'écoulement par l'installation de robinets électroniques	Choisir des robinets avec volume stagnant mitigé minimal (<10ml) et temps d'écoulement allongé	↓ Volume d'eau stagnant tiède
↓ Consommation et gaspillage	Laisser couler 20-30 secondes selon le débit	Ne pas consommer ou utiliser le premier jet
↓ Débit par l'installation d'aérateurs	Évaluer les risques particulièrement en milieu hospitalier	↓ Formation d'aérosols Choisir aérateurs sans biofilm
↓ Débit dans les robinets ou douches	À définir: débit minimal (5L/ minute dans les robinets)	↑ Rinçages fréquents et efficaces

5.4 Limites de l'étude

Cette étude comporte un bon nombre de limitations qui ont été identifiées suite aux analyses des résultats du projet de recherche. Celles-ci ont été soulevées par rapport aux choix de robinets, aux méthodes d'analyses et choix de bactérie, aux paramètres physico-chimiques et aux emplacements choisis.

La grande majorité des robinets électroniques faisant partie de l'étude avaient une manette à la base du robinet permettant un ajustement manuel de la température. Dans ce type de robinet, le volume mitigé stagnant est minimal et un rinçage avec de l'eau chaude est possible. Il aurait été intéressant de pouvoir faire une comparaison avec des robinets électroniques ne permettant pas un ajustement de température et ayant celle-ci située autour de 35 °C. L'hypothèse que certains types de robinets électroniques sont plus propices à la contamination demeure même si la

comparaison avec d'autres études laisse présager qu'il y aurait bel et bien une différence de contamination selon les types de robinets octroyant ou non un contrôle sur la température.

La sélection des robinets électroniques de l'étude s'est faite selon plusieurs critères, dont cibler les robinets dans des secteurs avec des patients à risque. Malgré cela, le repérage des robinets électroniques n'était pas nécessairement évident et l'accès à certains secteurs limités. Pour diversifier les types de robinets électroniques, il aurait fallu cibler d'autres établissements de santé.

L'âge des robinets faisant partie de l'étude n'était pas connu. Il pourrait y avoir une variation dans les résultats sachant si l'eau échantillonnée provenait d'un robinet récent par rapport à un vieux. Cette analyse n'a pu être complétée dans ce projet de recherche.

Afin de parfaire les connaissances au niveau de la contamination selon les types de robinets, davantage de robinets à pédales auraient également pu être échantillonnés. Il aurait été d'autant plus pertinent de réaliser un échantillonnage de douche ou de robinets thermostatés, pour effectuer un suivi suite à l'adoption de la réglementation limitant la température à 43 °C dans les secteurs avec des patients vulnérables.

Suite à l'analyse des résultats, il est difficile de poser un diagnostic en faveur de l'installation des robinets électroniques plutôt que des robinets à pédales. Une des conclusions de l'analyse statistique pointe vers la plus grande susceptibilité des robinets ayant une chambre de mélange distincte sans contrôle manuel. Toutefois, malgré le nombre restreint de robinets à pédales échantillonnés, une certaine augmentation du risque de contamination a été observée. Nous n'avons pas effectué de revue critique de la conception des robinets à pédales. Il est probable que le volume d'eau stagnante mitigée peut aussi être minimisé dans ce type de robinets.

Finalement le choix d'installer des robinets électroniques devrait aussi tenir compte du potentiel d'amplification d'autres pathogènes comme *L. pneumophila*, car des études récentes montrent que les robinets électroniques sont plus susceptibles à la contamination par cette bactérie. De plus, *L. pneumophila* est plus résistante aux plages de températures plus élevée que *P. aeruginosa*. Même si nous avons observé une différence de température moyenne de 10 °C entre les robinets conventionnels et les robinets électroniques, dû au prérglage possible ou aux clapets antiretour brisés, la température était supérieure à la plage idéale de croissance de *P. aeruginosa*.

Il est important de noter que les faibles concentrations observées dans l'eau ne permettent pas de conclure sur la présence de *P. aeruginosa* dans le biofilm de la robinetterie. Il est important de poursuivre les travaux pour mieux comprendre les conditions de développement du biofilm et les phénomènes pouvant causer un relargage dans l'eau. Toutefois, le meilleur indicateur demeure l'eau plutôt que le biofilm puisqu'il est plus représentatif du contact qu'auront les clientèles vulnérables avec les organismes.

La culture a été privilégiée comme méthode d'analyse puisque les seuils recommandés sont des seuils en culture, soit $>1\text{-}10$ UFC / 100 mL dans le cas de la France et du Royaume-Uni. Avec la méthode enzymatique, ces seuils seront atteint plus souvent et à plus de sites. Des analyses par PCR auraient pu être envisagées, mais c'est une technique dispendieuse, compliquée et qui prend beaucoup de temps et d'expérience de laboratoire.

Les analyses ont été complétées dans des hôpitaux semblables, c'est à dire dans de vieux bâtiments avec des réseaux dominés par la présence des conduites de cuivre. L'alimentation en eau provenait de la même usine de traitement dans 3 endroits sur 4. Si d'autres analyses devaient être réalisées, il faudrait visiter d'autres hôpitaux dans les villes voisines, présentant des profils différents de dureté ou de biostabilité de l'eau. Également, il sera intéressant de voir comment évolueront les bactéries dans les nouveaux hôpitaux en construction dans lesquels le système de distribution d'eau potable sera principalement composé de la tuyauterie de plastique. Des analyses bactériologiques seraient pertinentes avant et durant la mise en service, mais également au fil des ans.

En terminant, concernant les mesures de chlore et cuivre, il aurait été opportun de compléter les analyses suites à une période de stagnation connue et non pas selon un échantillonnage aléatoire dans le cas du cuivre et au 2^e litre pour le chlore. Une période de douze heures pour le cuivre et quelques heures pour le chlore aurait été idéale avant d'effectuer les mesures. Toutefois, le premier jet étant nécessaire pour l'analyse de bactérie, nous devions mesurer le chlore après le premier litre. Le cuivre a pu être analysé avec le premier jet lors de la caractérisation. Il était toutefois impossible de connaître les temps de stagnation avant les analyses. Quelques mesures supplémentaires de cuivre réalisées en séquentiel, en connaissant le temps de stagnation avant l'analyse, auraient été pertinentes afin de mieux comprendre l'évolution de la concentration de cuivre du robinet jusque dans le système de distribution.

CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

Ce projet de recherche a permis d'approfondir les connaissances quant à la colonisation par *P. aeruginosa* des systèmes de distribution d'eau potable dans les établissements de santé et de confirmer que certains types de robinets sont plus susceptibles à la contamination que d'autres. Les principales conclusions de cette étude sont les suivantes :

- *P. aeruginosa* colonise principalement les drains (51 %) et est moins fréquemment isolé dans l'eau (4 % par culture et 16 % par méthode enzymatique) et à la surface externe des aérateurs (1 %).
- Les robinets électroniques ayant un ajustement manuel de la température au bas du robinet, sans volume de stagnation significatif, ne sont pas plus contaminés que les robinets conventionnels (15 % de contamination pour ce type de robinets électroniques contre 14 % pour les robinets conventionnels).
- Les robinets électroniques ayant un contrôle de température séparé du robinet et donc un volume mitigé légèrement plus important ainsi que les robinets à pédales sont plus fréquemment contaminés par *P. aeruginosa* que les autres types de robinets.
- Il est difficile d'identifier des modèles ou marques problématiques étant donné le faible nombre de robinets analysés du même type et le petit nombre de robinets contaminés.
- Les conduites de raccordement tressées flexibles étaient plus susceptibles de maintenir et même d'augmenter les concentrations libres et fixées de *P. aeruginosa* comparativement aux tuyaux de cuivre.
- La majorité des robinets électroniques sont raccordés par des conduites en tressé flexible (88 %). Ils sont plus susceptibles à la contamination par *P. aeruginosa* en raison de leur plus grande capacité de support de biofilm et de l'absence de cuivre qui joue un rôle inhibiteur.
- La présence d'un aérateur positif, la température de l'eau chaude mesurée après 1 minute et la concentration de cuivre dans l'eau sont des facteurs significatifs dans la prédiction des concentrations de *P. aeruginosa* dans l'eau.
- La température de l'eau chaude est un facteur important puisqu'elle limite la prolifération bactérienne pendant le rinçage. Les robinets électroniques, les douches et les robinets thermostatés sont désavantagés par rapport aux robinets manuels parce que la température

de l'eau chaude dans ces dispositifs est moins élevée et qu'une purge d'eau chaude est difficile ou, dans certains cas, impossible.

- La contamination par *P. aeruginosa* est beaucoup plus importante au premier jet, correspondant à l'eau provenant du robinet et sa conduite de raccord, mais il est possible de détecter une légère présence dans le système de distribution d'eau froide.
- Certaines analyses positives pour *P. aeruginosa* par culture ou détection enzymatique ont été obtenues dans l'eau de robinets desservant des clientèles vulnérables. Certains niveaux observés par culture excèdent les recommandations internationales de 10 UFC/100mL.
- La méthode de détection enzymatique est plus sensible que la méthode de culture.

Quoique les résultats de cette étude ne présentent pas tous les éléments de réponse sur la vulnérabilité des robinets électroniques à la contamination par *P. aeruginosa*, il est tout de même possible de formuler des recommandations à court et à long termes en tenant compte des résultats d'autres études publiées.

À court terme, les principales recommandations de cette étude applicables dans les établissements de santé sont les suivantes :

- Effectuer rapidement une analyse de risque aux sites positifs par *P. aeruginosa* en tenant compte des niveaux de contamination et du type de patients desservis et mettre en place les mesures de prévention appropriées (suivi, rinçage à l'eau chaude, désinfection, utilisation de filtres distaux, etc.)
- Identifier et remplacer les robinets électroniques ayant des vannes de mélange séparées du robinet.
- Identifier et remplacer les aérateurs complexes et installer des aérateurs amovibles de structure simple et constitués de matériaux ne favorisant pas la croissance de biofilm.
- Choisir des robinets ayant la structure interne la plus simple possible, fabriqués de matériaux non propices à la croissance du biofilm et ayant un volume d'eau stagnante le plus faible possible.
- Exiger l'utilisation de conduites en tressé flexible ayant une certification de faible potentiel de croissance bactérien, comme celle exigée dans la communauté européenne.

- Minimiser la longueur de raccordement en tressé flexible.
- Privilégier les robinets à activation électronique avec contrôle mitigé manuel et non thermostatés.
- Si un robinet thermostaté doit être installé, prévoir la possibilité de rinçage manuel (contrôle local) avec de l'eau chaude et choisir des modèles munis de clapets robustes ou considérer l'installation de clapets robustes additionnels pour minimiser les risques de mélange entre l'eau chaude et l'eau froide.
- Conserver la tuyauterie en cuivre lorsque possible.
- Mettre de l'avant un programme de rinçage préventif à l'eau chaude des robinets, particulièrement des robinets électroniques dans les secteurs avec des patients à risque, et après une fermeture de secteur.
- Supprimer les points d'eau peu utilisés et éliminer les conduites en cul-de-sac.
- Trouver une solution pour éviter que les utilisateurs soient exposés au premier jet des robinets électroniques (activation sans mouillage des mains).
- Réviser les devis de remplacement ou d'installation de nouveaux robinets pour tenir compte de la prévention de la contamination par *P. aeruginosa* (matériaux, structure interne, etc.) et le choix d'aérateur minimisant la formation d'aérosols et d'éclaboussures. Ne pas spécifier des robinets ayant des débits réduits même dans les salles de bain.
- Réviser les devis de choix d'évier pour assurer le choix de modèle assurant un drainage adéquat, une distance entre le drain et le bec du robinet minimisant la rétro-contamination, et minimisant la formation et la dispersion d'éclaboussures. Il est impératif que le drainage des eaux soit efficace et que la capacité des conduites de collecte soit suffisante.
- Sensibiliser le personnel au fait que les drains sont fréquemment contaminés et que des précautions doivent être prises pour minimiser les éclaboussures et pour tenir compte de leur potentiel de contamination du personnel et du matériel.
- Sensibiliser le personnel soignant à laisser couler l'eau au moins une dizaine de secondes avant utilisation. Il est fortement recommandé de ne pas utiliser le premier jet pour le lavage des mains ou le rinçage de matériel médical.

À moyen et long terme, les principales recommandations de cette étude applicables dans les établissements de santé visent à :

1) Compléter des études additionnelles qui permettront d'identifier les spécifications des robinets d'évier et de douches ayant le plus faible potentiel de croissance de *P. aeruginosa*.

- Effectuer un suivi de la contamination des douches et de robinets thermostatés à 43 °C pour établir le risque de contamination dans ces dispositifs qui sont installés en grand nombre en réponse au décret de la RBQ.
- Compléter des mesures sur un plus grand nombre de robinets à pédales, en considérant le matériau de raccordement utilisé.
- Compléter des analyses sur les raccords en tressé flexible disponibles sur le marché nord-américain selon les protocoles européens pour déterminer les marques ayant un faible potentiel de croissance de biofilm et pouvant être utilisés dans les établissements hospitaliers.
- Compléter l'analyse de risque de prolifération de *Legionella pneumophila* dans les robinets d'évier et de douche pour choisir des dispositifs ayant des spécificités permettant de contrôler ces deux bactéries opportunistes aux points d'usage.

2) Évaluer le risque de colonisation dans les nouveaux bâtiments ou établissements desservant des clientèles vulnérables. Les nouveaux bâtiments n'utilisent pas ou peu de cuivre. Or, nos travaux et ceux d'autres chercheurs ont montré que le cuivre joue un rôle d'inhibiteur. De plus, la mise en eau des bâtiments pour vérifications hydrauliques pendant la mise en route du réseau expose les conduites à des stagnations prolongées qui ont été reliées à des contaminations majeures et éclosions. Un échantillonnage dans les nouveaux hôpitaux avant l'ouverture et pendant la mise en route apparaît hautement souhaitable étant donné l'utilisation de matériaux polymériques et plastiques pour le réseau de distribution interne et l'installation de robinets électroniques.

3) Poursuivre les travaux de validation de la méthode de détection enzymatique et fixer des seuils de gestion. Cette méthode d'analyse de suivi de *P. aeruginosa* est efficace, simple et donne une réponse rapide.

RÉFÉRENCES

- Adto, & Cordler. (2012). Le guide de la plomberie. Mieux comprendre pour bien choisir. Fine Media. 141.
- Asghari, F. B., Nikaeen, M., & Mirhendi, H. (2013). Rapid monitoring of *Pseudomonas aeruginosa* in hospital water systems: A key priority in prevention of nosocomial infection. *FEMS Microbiology Letters*, 343(1), 77-81. doi: 10.1111/1574-6968.12132
- ASHE, APIC, & SHEA. (2011). Joint ASHE, APIC, and SHEA Response to Electronic Faucet Technology (pp. 2). Tiré de : <http://www.shea-online.org/Portals/0/Joint%20ASHE%20APIC%20SHEA%20Update%20on%20Electronic%20Faucets-final%206%2023%2011%204%2030pm.pdf>
- Assadian, O., El-Madani, N., Seper, E., Mustafa, S., Aspöck, C., Koller, W., Rotter, M., & Dipbact. (2002). Sensor-operated faucets: a possible source of nosocomial infection? *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 23(1), 44-46.
- Bartram, J., Chartier, Y., Lee, J. V., Pond, K., & Surman-Lee, S. (2007). *Legionella* and the prevention of legionellosis. Geneva: World Health Organization 2007
- Bédard, E., Charron, D., Lalancette, C., Déziel, E., & Prévost, M. (2014). Recovery of *Pseudomonas aeruginosa* culturability following copper- and chlorine-induced stress. *FEMS Microbiology Letters*, 9. doi: 10.1111/1574-6968.12494
- Berthelot, P., Chord, F., Mallaval, F., Grattard, F., Brajon, D., & Pozzetto, B. (2006). Magnetic valves as a source of faucet contamination with *Pseudomonas aeruginosa*? *Intensive Care Medicine*, 32(8), 1271-1271. doi: 10.1007/s00134-006-0206-6
- Blanc, D. S., 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 Medicine*, 30(10), 1964-1968. doi: 10.1007/s00134-004-2389-z
- Boucher, I., Blais, P., & Vive en Ville. (2010). Le bâtiment durable, Guide de bonnes pratiques sur la planification territoriale et le développement durable. Gouvernement du Québec, Ministère des Affaires municipales du Québec, des Régions et de l'Occupation du territoire (MAMROT), 92.
- Bressler, D., Balzer, M., Dannehl, A., Flemming, H.-C., & Wingender, J. (2009). Persistence of *Pseudomonas aeruginosa* in drinking-water biofilms on elastomeric material. *Water Science and Technology: Water Supply*, 9(1), 81-87.
- British Standards Institution (BSI). (2011). BS 8558:2011 Guide to the design, installation, testing and maintenance of services supplying water for domestic use within buildings and their curtilages – Complementary guidance to BS EN 806: BSI 1-94.

- Brown, A. D. (1957). Some general properties of a Psychrophilic Pseudomonad: the effects of temperature on some of these properties and the utilization of glucose by this organism and *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of General Microbiology*, 17(3), 640-648.
- California Environmental Protection Agency, Pesticide and Environmental Toxicology Branch, & Office of Environmental Health Hazard Assessment. (2008). Public health goals for copper in drinking water. California, 1-67.
- Centers for Disease Control (CDC). (2003). Guidelines for environmental infection control in health-care facilities. Altanta, Georgia, USA: Centers for Disease Control and Prevention (CDC), United States Department of Health and Healthcare Infection Control Partices Advisory Committee (HICPAC), 86.
- Centers for Disease Control (CDC). (2005). Procedures for the recovery of Legionella from the environment. 15.
- Chaberny, I. F., & Gastmeier, P. (2004). Should electronic faucets be recommended in hospitals? *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 25(11), 997-1000.
- Cholley, P., Thouverez, M., Floret, N., Bertrand, X., & Talon, D. (2008). The role of water fittings in intensive care rooms as reservoirs for the colonization of patients with *Pseudomonas aeruginosa*. *Intensive Care Medicine*, 34(8), 1428-1433. doi: 10.1007/s00134-008-1110-z
- Colbourne, J. S. (1985). Materials usage and their effects on the microbiological quality of water supplies. *Journal of Applied Microbiology*, 59, 47S-59S.
- Cristina, M. L., Spagnolo, A. M., Casini, B., Baggiani, A., Del Giudice, P., Brusaferro, S., Poscia, A., Moscato, U., Perdelli, F., & Orlando, P. (2014). The impact of aerators on water contamination by emerging gram-negative opportunists in at-risk hospital departments. *Infection control and hospital epidemiology*, 35(2), 122-129. doi: 10.1086/674863
- Department of Health (DH), Estates & Facilities, & Government of Great Britain. (2013). Water systems : HTM 04-01: Addendum. *Pseudomonas aeruginosa* - advice for augmented care units. 37. Tiré de : https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/140105/Health_Technical_Memorandum_04-01_Addendum.pdf
- Department of Health (DH), & Estates and Facilities Division. (2006a). Water systems : health technical memorandum 04-01 : The control of *Legionella*, hygiene, "safe" hot water, cold water and drinking water systems. Part A: Design, installation and testing. 80. Tiré de : https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/144147/HTM_04-01_Part_A.pdf

Department of Health (DH), & Estates and Facilities Division. (2006b). Water systems : health technical memorandum 04-01 : The control of *Legionella*, hygiene, "safe" hot water, cold water and drinking water systems. Part B: Operational management. London: Stationery Office. 48. Tiré de : https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/144148/HTM_04-01_Part_B.pdf

Döring, G., Ulrich, M., Müller, W., Bitzer, J., Schmidt-Koenig, L., Münst, L., Grupp, H., C., W., Stern, M., & Botzenhart, K. (1991). Generation of *Pseudomonas aeruginosa* aerosols during handwashing from contaminated sink drains, transmission to hands of hospital personnel, and its prevention by use of a new heating device. *International journal of hygiene and environmental medicine*, 191(5-6), 494-505.

Durojaiye, O. C., Carbars, N., Murray, S., & Majumdar, S. (2011). Outbreak of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in an intensive care unit. *Journal of Hospital Infection*, 78(2), 154-155.

Dwidjosiswojo, Z., Richard, J., Moritz, M. M., Dopp, E., Flemming, H.-C., & Wingender, J. (2011). Influence of copper ions on the viability and cytotoxicity of *Pseudomonas aeruginosa* under conditions relevant to drinking water environments. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 214(6), 485-492.

Ehrhardt, D., Terashita, D., & English, T. (2006). An outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* in neonatal intensive care unit, Los Angeles County, 2006. Acute communicable disease control program, 53-55.

Exner, M. (2012). Wasser als Infektionsquelle : Leitungswasser: Klar und sauber? *Heilberufe*, 64(10), 24-27. doi: 10.1007/s00058-012-1041-5

Exner, M., Kramer, A., Lajoie, L., Gebel, J., Engelhart, S., & Hartemann, P. (2005). Prevention and control of health care-associated waterborne infections in health care facilities. *American Journal of Infection Control*, 33(5, Supplement), S26-S40. doi: 10.1016/j.ajic.2005.04.002

Facility Guidelines Institute (FGI). (2013). Sustainable design guidelines for hospitals and outpatient facilities. 20. Tiré de : http://www.fgiguidelines.org/pdfs/FGI_SustainabilityWhitePaper_130812_for_comment.pdf

Ferroni, A., Nguyen, L., Pron, B., Quesne, G., Brusset, M.-C., & Berche, P. (1998). Outbreak of nosocomial urinary tract infections due to *Pseudomonas aeruginosa* in a paediatric surgical unit associated with tap-water contamination. *Journal of Hospital Infection*, 39(4), 301-307.

Flemming, H. C., & Bendinger, B. (2014). The last meters before the tap: where drinking water quality is at risk (chapter 8). In D. van der Kooij & P. W. van der Wielen (Eds.),

- Microbial growth in drinking-water distribution systems. Problems, causes, prevention and research needs* (pp. 207-238). London, UK: IWA Publishing.
- Gouvernement du Québec. (2012). Décret 1202-2012, 12 décembre 2012. Règlement modifiant le code de construction. Gazette officielle du Québec, 27 décembre 2012 5723-5724.
- Halabi, M., Wiesholzer-Pittl, M., Schöberl, J., & Mittelmayer, H. (2001). Non-touch fittings in hospitals: a possible source of *Pseudomonas aeruginosa* and *Legionella* spp. *Journal of Hospital Infection*, 49(2), 117-121.
- Hardalo, C., & Edberg, S. C. (1997). *Pseudomonas aeruginosa*: Assessment of risk from drinking water. *Critical Reviews in Microbiology*, 23(1), 47-75.
- Health and Safety Executive (HSE). (2013). Legionnaires'disease: Technical guidance. Part 2: The control of *Legionella* bacteria in hot and cold water systems. 65.
- Health Facilities Scotland (HFS). (2009). Flexible water supply hoses: Risk of harmful micro-organisms. 2. Tiré de : http://www.google.ca/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CCIQFjAA&url=http%3A%2Fwww.hfs.scot.nhs.uk%2Fpublications%2F1259586652-SAN0903.pdf&ei=ryX9U7qOEIb9yQSBj4CgDQ&usg=AFQjCNFWr0FwiBBJlvKbgAvILeAdJt9Qw&sig2=o0kT_Tu1aJorAPMIPB0YrA&bvm=bv.74035653,d.aWw
- Hota, S., Hirji, Z., Stockton, K., Lemieux, C., Dedier, H., Wolfaardt, G., & Gardam, M. A. (2009). Outbreak of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* colonization and infection secondary to imperfect intensive care unit room design. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 30(1), 25-33.
- Institut national de santé Publique du Québec (INSPQ). (2013). Bactériémies nosocomiales panhospitalières : Résultats de surveillance 2012-2013.: Surveillance provinciale des infections nosocomiales 20.
- Institut national de santé publique du Québec (INSPQ), & Gouvernement du Québec. (2009). Position du Comité sur les infections nosocomiales du Québec sur les risques associés à l'utilisation des robinets électroniques en milieux de soins. 24. Tiré de : http://www.inspq.qc.ca/pdf/publications/1008_CINQRisquesRobinetsElectroniques.pdf
- International Organization for Standardization (ISO). (2006). 16266 Water quality - detection and enumeration of *Pseudomonas aeruginosa* – method by membrane filtration. 12. Tiré de : <https://www.iso.org/obp/ui/#!iso:std:iso:16266:ed-1:v1:en>
- Kerr, K. G., & Snelling, A. M. (2009). *Pseudomonas aeruginosa*: A formidable and ever-present adversary. *Journal of Hospital Infection*, 73(4), 338-344. doi: 10.1016/j.jhin.2009.04.020

- Kilb, B., Lange, B., Schaule, G., Flemming, H.-C., & Wingender, J. (2003). Contamination of drinking water by coliforms from biofilms grown on rubber-coated valves. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 206(6), 563-573.
- Lavenir, R., Sanroma, M., Gibert, S., Crouzet, O., Laurent, F., Kravtsoff, J., Mazoyer, M. A., & Cournoyer, B. (2008). Spatio-temporal analysis of infra-specific genetic variations among a *Pseudomonas aeruginosa* water network hospital population: Invasion and selection of clonal complexes. *Journal of Applied Microbiology*, 105(5), 1491-1501. doi: 10.1111/j.1365-2672.2008.03907.x
- Lee, D. G., Urbach, J. M., Wu, G., Liberati, N. T., Feinbaum, R. L., Miyata, S., Diggins, L. T., He, J., Saucier, M., Déziel, E., Friedman, L., Li, L., Grills, G., Montgomery, K., Kucherlapati, R., Rahme, L. G., & Ausubel, F. M. (2006). Genomic analysis reveals that *Pseudomonas aeruginosa* virulence is combinatorial. *Genome biology*, 7(10), R90. doi: 10.1186/gb-2006-7-10-r90
- Leprat, R., Denizot, V., Bertr, X., & Talon, D. (2003). Non-touch fittings in hospitals: A possible source of *Pseudomonas aeruginosa* and *Legionella spp.* *Journal of Hospital Infection*, 53(1), 77.
- Levin, M. H., Olson, B., Nathan, C., Kabins, S. A., & Weinstein, R. A. (1984). Pseudomonas in the sinks in an intensive care unit: relation to patients. *Journal of Clinical Pathology*, 37(4), 424-427.
- Loveday, H. P., Wilson, J., Kerr, K., Pitchers, R., Walker, J. T., & Browne, J. (2014). Association between healthcare water systems and *Pseudomonas aeruginosa* infections: A rapid systematic review. *Journal of Hospital Infection*, 86(1), 7-15. doi: 10.1016/j.jhin.2013.09.010
- Mäkinen, R., Miettinen, I. T., Pitkänen, T., Kusnetsov, J., Pursiainen, A., Kovánen, S., Riihinen, K., & Keinänen-Toivola, M. M. (2013). Manual faucets induce more biofilms than electronic faucets. *Canadian Journal of Microbiology*, 59(6), 407-412. doi: 10.1139/cjm-2013-0131
- McCoy, W. F. (2005). Preventing Legionellosis. *Water 21*, 12, 34-36.
- McTargett, C. (2001). Electronic faucet development goes with the flow. *Plumbing & Mechanical*, 19(7), 84-94.
- Mena, K. D., & Gerba, C. P. (2009). Risk assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in water. In D. M. Whitacre (Ed.), *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* (Vol. 201, pp. 71-115): Springer US.
- Merrer, J., Girou, E., Ducellier, D., Clavreul, N., Cizeau, F., Legrand, P., & Leneveu, M. (2005). Should electronic faucets be used in intensive care and hematology units? *Intensive Care Medicine*, 31(12), 1715-1718. doi: 10.1007/s00134-005-2824-9

Ministère des Affaires municipales, des Régions et de l'Occupation du Territoire (MAMROT) (2011). Stratégie québécoise d'économie d'eau potable. Gouvernement du Québec, 38. Tiré de : <http://www.mddelcc.gouv.qc.ca/eau/politique/politique-integral.pdf>

Ministère du Développement Durable de l'Environnement et des Parcs (MDDEP). (2002). L'eau. La vie. L'avenir. Politique nationale de l'eau. Canada: Gouvernement du Québec, 103.

Ministère du Développement Durable de l'Environnement et des Parcs (MDDEP). (2010). Loi sur la qualité de l'environnement, Qualité de l'eau potable (2010).

Moore, G., & Walker, J. (2014). Chapter Seventeen - Presence and Control of *Legionella pneumophila* and *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms in Hospital Water Systems. In S. L. Percival, D. W. Williams, J. Randle & T. Cooper (Eds.), *Biofilms in Infection Prevention and Control* (pp. 311-337). Boston: Academic Press.

Moritz, M. M. (2011). Integration of hygienically relevant bacteria in drinking water biofilms grown on domestic plumbing materials. Universität Duisburg-Essen.

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. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 213(3), 190-197.

NSF International Standard, & American National Standard (ANSI). (2007). Drinking water system components - health effects (NSF/ANSI 61-2007a) (Vol. NSF/ANSI 61 - 2007a, pp. 186).

Petignat, C., Francioli, P., Nahimana, I., Wenger, A., Bille, J., Schaller, M., Revelly, J. P., Zanetti, G., & Blanc, D. (2006). Exogenous sources of *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care unit patients: Implementation of infection control measures and follow-up with molecular typing. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 27(9), 953-957.

Régie du bâtiment du Québec (RBQ). (2014). Modifications du Québec applicables au Code national de la plomberie Canada 2010. (Code de construction du Québec, chapitre III, Plomberie). 67. Tiré de : <https://www.r bq.gouv.qc.ca/fileadmin/medias/pdf/Publications/francais/modifications-du-quebec-au-code-national-plomberie-2010.pdf>

Regnath, T., Kreutzberger, M., Illing, S., Oehme, R., & Liesenfeld, O. (2004). Prevalence of *Pseudomonas aeruginosa* in households of patients with cystic fibrosis. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 207(6), 585-588. doi: <http://dx.doi.org/10.1078/1438-4639-00331>

République Française, & Ministère de la Santé et des Solidarités. (2005). L'eau dans les établissements de santé (Guide technique). (République Française). Paris, France:

Direction de l'Hospitalisation et de l'Organisation des Soins, Direction Générale de la Santé 120. Tiré de: http://www.cclinparisnord.org/ACTU_DIVERS/ministEAU2005.pdf.

- Rogers, J., Dowsett, A. B., Dennis, P. J., Lee, J. V., & Keevil, C. W. (1994a). Influence of plumbing materials on biofilm formation and growth of *Legionella pneumophila* in potable water systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(6), 1842-1851.
- Rogers, J., Dowsett, A. B., Dennis, P. J., Lee, J. V., & Keevil, C. W. (1994b). Influence of temperature and plumbing materials selection on biofilm formation and growth of *Legionella pneumophila* in model potable water systems contaminating complex microbial flora. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(5), 1585-1592.
- Rogues, A. M., Boulestreau, H., Lashéras, A., Boyer, A., Gruson, D., Merle, C., Castaing, Y., Bébear, C. M., & Gachie, J. P. (2007). Contribution of tap water to patient colonisation with *Pseudomonas aeruginosa* in a medical intensive care unit. *Journal of Hospital Infection*, 67(1), 72-78.
- Schneider, H., Geginat, G., Hogardt, M., Kramer, A., Durken, M., Schroten, H., & Tenenbaum, T. (2012). *Pseudomonas aeruginosa* outbreak in a pediatric oncology care unit caused by an errant water jet into contaminated siphons. *The Pediatric infectious disease journal*, 31(6), 648-650. doi: 10.1097/INF.0b013e31824d1a11.
- Semproni, M., Briancesco, R., Giampaoli, S., Gianfranceschi, G., Paradiso, R., Romano Spica, V., Valeriani, F., & Bonadonna, L. (2014). Confronto di metodi colturali per il rilevamento di *Pseudomonas aeruginosa*: Il metodo di riferimento UNI EN ISO 16266 e il metodo alternativo Pseudalert. *Annali di igiene: medicina preventiva e di comunità*, 26(1), 110-118.
- Serrano-Suarez, A., Dellunde, J., Salvado, H., Cervero-Arago, S., Mendez, J., Canals, O., Blanco, S., Arcas, A., & Araujo, R. (2013). Microbial and physicochemical parameters associated with *Legionella* contamination in hot water recirculation systems. *Environmental science and pollution research international*, 20(8), 5534-5544. doi: 10.1007/s11356-013-1557-5
- Shrivastava, R., Upreti, R. K., Jain, S. R., Prasad, K. N., Seth, P. K., & Chaturvedi, U. C. (2004). Suboptimal chlorine treatment of drinking water leads to selection of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 58(2), 277-283.
- SLOAN. (2010). Battery powered hand washing faucet: EBF-187 (pp. 2). Tiré de : http://www.sloanvalve.com/Specifications/Optima_Plus_EBF-187.pdf
- Spinks, A. T., Dunstan, R. H., Harrison, T., Coombes, P., & Kuczera, G. (2006). Thermal inactivation of water-borne pathogenic and indicator bacteria at sub-boiling temperatures. *Water Research*, 40(6), 1326-1332. doi: 10.1016/j.watres.2006.01.032

- Sydnor, E. R., Bova, G., Gamburg, A., Cosgrove, S. E., Perl, T. M., & Maragakis, L. L. (2012). Electronic-eye faucets: *Legionella* species contamination in healthcare settings. *Infection Control and Hospital Epidemiology* 33(3).
- The European Working Group for Legionella Infections (EWGLI), Commission, T. E., & The European Centre of Disease Prevention and Control (ECDC). (2011). EWGLI technical guidelines for the investigation, control and prevention of travel associated legionnaires' diseases. 80.
- Tsvetanova, Z. G., & Hoekstra, E. J. (2010). The effect of the surface-to-volume contact ratio on the biomass production potential of the pipe products in contact with drinking water. *Water Science and Technology: Water Supply*, 10(1), 105-112.
- United States Environmental Protection Agency (USEPA). (1994). Method 200.8 - Determination of trace elements in waters and wastes by inductively coupled plasma - mass spectrometry (Revision 5.4 - EMMC Version). Cincinnati, Ohio, USA: Office of Research and Development, 57.
- 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. *Journal of Hospital Infection*, 60(3), 235-239. doi: 10.1016/j.jhin.2004.11.023
- Vianelli, N., Giannini, M. B., Quarti, C., Bucci Sabattini, M. A., Fiacchini, M., de Vivo, A., Graldi, P., Galli, S., Nanetti, A., Baccarani, M., & Ricci, P. (2006). Resolution of a *Pseudomonas aeruginosa* outbreak in a hematology unit with the use of disposable sterile water filters. *Haematologica*, 91(7), 983-985.
- Walker, J. T., Jhutty, A., Parks, S., Willis, C., Copley, V., Turton, J. F., Hoffman, P. N., & Bennett, A. M. (2014). Investigation of healthcare-acquired infections associated with *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in taps in neonatal units in Northern Ireland *Journal of Hospital Infection*, 86(1), 16–23.
- Water Regulations Advisory Scheme (WRAS). (2006). EPDM flexible hoses (pp. 2). Tiré de : [http://www.wrás.co.uk/PDF_Files/InfoNote%20%20EPDM%20hoses%20January%2006.pdf](http://www.wrás.co.uk/PDF_Files/InfoNote%20%20EPDM%20hoses%20January%202006.pdf)
- World Health Organization (WHO). (2005). Water safety plans in public buildings. Norwich, United Kingdom: University of East Anglia.
- Xue, Z., Hessler, C. M., Panmanee, W., Hassett, D. J., & Seo, Y. (2013). *Pseudomonas aeruginosa* inactivation mechanism is affected by capsular extracellular polymeric substances reactivity with chlorine and monochloramine. *FEMS Microbiol Ecol*, 83(1), 101-111. doi: 10.1111/j.1574-6941.2012.01453.x
- Yapicioglu, H., Gokmen, T. G., Yildizdas, D., Koksal, F., Ozlu, F., Kale-Cekinmez, E., Mert, K., Mutlu, B., Satar, M., Narli, N., & Candevir, A. (2011). *Pseudomonas aeruginosa*

infections due to electronic faucets in a neonatal intensive care unit. *Journal of Paediatrics and Child Health.*

ANNEXES

ANNEXE 1 Article: Recovery of *Pseudomonas aeruginosa* culturability following copper – and chlorine – induced stress

RESEARCH LETTER

Recovery of *Pseudomonas aeruginosa* culturability following copper- and chlorine-induced stress

Emilie Bedard^{1,2}, Dominique Charron², Cindy Lalancette¹, Eric Deziel¹ & Michele Prevost²

¹Department of Civil Engineering, Polytechnique Montréal, Montréal, QC, Canada; and ²INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, QC, Canada

Correspondence: Emilie Bedard, NSERC Industrial Chair in Drinking Water, Polytechnique Montréal, P.O. Box 6079 Station Centre-ville, Montréal, QC, Canada H3C 3A7. Tel.: +1 514 340 4711, ext. 3711; fax: +1 514 340 5918; e-mail: emilie.bedard@polymtl.ca

Received 19 March 2014; revised 27 May 2014; accepted 30 May 2014.

DOI: 10.1111/1574-6968.12494

Editor: Simon Silver

Keywords
viable but nonculturable; drinking water; internal plumbing; hospital; opportunistic pathogen.

Abstract

This study investigated how quickly cells of the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* recover culturability after exposure to two of the most common environmental stressors present in drinking water, free chlorine and copper ions. Viable but nonculturable (VBNC) *P. aeruginosa* undetected by direct culturing following exposure to free chlorine or copper ions can survive in drinking water systems, with potential to recover, multiply, and regain infectivity. Cells were exposed to copper sulfate ($0.25 \text{ mg Cu}^{2+} \text{ L}^{-1}$) or free chlorine (initial dose of $2 \text{ mg Cl}_2 \text{ L}^{-1}$) for 24 h. Despite total loss of culturability and a reduction in viability from 1.2×10^7 to $4 \times 10^3 \text{ cells mL}^{-1}$ (3.5 log), cells exposed to chlorine recovered viability quickly after the depletion of free chlorine, while culturability was recovered within 24 h. Copper ions did not depress viability, but reduced culturability from 3×10^7 to $2.3 \times 10^2 \text{ cells mL}^{-1}$ (5.1 log); VBNC cells regained culturability immediately after copper ion chelation. A comparison between direct culturing and Pseud-alert, a specific enzyme-based assay,^a was performed. Both detection methods were well correlated in the range of 10^2 – $10^{10} \text{ cells L}^{-1}$. However, correlations between the methods declined after exposure to copper ions.

Introduction

Pseudomonas aeruginosa is an important source of nosocomial infections and the most frequently recovered Gram-negative bacterium from patients with nosocomial pneumonia in the USA (Weinstein et al., 2005). For cystic fibrosis patients, it is the primary cause of morbidity (Pier, 2012) and a major predictor of mortality (Emerson et al., 2002). It can also cause bacteraemia, urosepsis and secondary wound infections, including burns infection (Kerr & Snelling, 2009). Sources of transmission are multiple, but water is believed to be an important contributor for the transmission of *P. aeruginosa* in hospitals (Trautmann et al., 2005). In most intensive care unit outbreaks investigated, water has been implicated either directly or indirectly (Ferroni et al., 1998; Ehrhardt et al., 2006; Vianelli et al., 2006; Hota et al., 2009; Durojaiye et al., 2011; Yapicioglu et al., 2011; Schneider et al., 2012). According to recent information, 30–50% of *P. aeruginosa* infections in intensive care units are associated with water (Exner, 2012).

The detection of *P. aeruginosa* in drinking water presents several challenges, including its preference for biofilm vs. planktonic state as well as its presence in low and variable concentrations. Moreover, environmental factors such as nutrient-poor conditions and the presence of inhibitors and stressors can lead to a dominance of the viable but nonculturable (VBNC) state. Cells in the VBNC state are still alive and capable of metabolic activity but fail to multiply and grow on routine media on which they would normally grow (Oliver, 2005). A VBNC state has not been typically associated with *P. aeruginosa* and its presence in environmental samples has not fully been assessed. When monitoring for *P. aeruginosa* at drinking water taps, two main environmental stresses can be present: disinfectant residual and metals ions from plumbing (copper, zinc and lead). Depending on prior stagnation and residual chlorine concentration at the time of sampling, traditional culture methods may fail to reveal the presence of VBNC *P. aeruginosa* because of the impact of these factors on culturability. This is a well-known phenomenon for *Vibrio cholerae* in aquatic

environments (Xu et al., 1982). The toxicity of copper ions to culturable *P. aeruginosa* cells has been documented at relatively high concentrations (Teitzel & Par-sek, 2003; Harrison et al., 2005; Teitzel et al., 2006; Elguindi et al., 2009). However, the direct relevance of these results to conditions prevailing in drinking water systems is limited because of the following: (1) the use of growth media or mineral salt solutions in which the availability of toxic free copper ions varies with the level of chelation and binding; and (2) the systematic quench-ing of copper ions before enumeration. The impact of copper ions on culturable and VBNC *P. aeruginosa* was verified in drinking water containing realistic copper con-centrations ($63.5 \text{ lg Cu}^{2+} \text{ L}^{-1}$) showing a greater sensitivity to copper ions and an overwhelming effect of added chelators (Moritz et al., 2010). VBNC *P. aeruginosa* cells undetected by culture can survive in the system, and eventually recover and multiply when stressors are removed, for example free-chlorine depletion during stag-nation periods. Furthermore, VBNC cells can also recover cytotoxicity as shown by the reversible VBNC state of suspended *P. aeruginosa* induced by copper ions (Dwidjo-siswoyo et al., 2011).

The objectives of this study were (1) to estimate the impact of free chlorine and copper ions stresses on culturable and VBNC suspended *P. aeruginosa* cells under conditions representative of internal plumbing, (2) to test a new specific enzymatic activity-based assay for the increased recovery of stressed bacteria and (3) to quantify the recovery of *P. aeruginosa* after stress interruption for both free chlorine and copper ions.

Materials and methods

Bacterial strain and culture conditions

Experiments were performed with *P. aeruginosa* strain PA14 (Lee et al., 2006) grown in Tryptic Soy Broth (Difco, Detroit, MI) overnight at 37°C . Cells were harvested by centrifugation (3000 g for 30 min), washed twice in sterile 2 mM phosphate buffer, and suspended at a final estimated cell density of $5 \times 10^9 \text{ cells mL}^{-1}$.

Experimental conditions

Sterile polypropylene bottles containing 500 mL of 2 mM phosphate buffer ($\text{pH } 7.3 \pm 0.1$) were inoculated (final concentration $10^7 \text{ cells mL}^{-1}$). A control cell suspension was not exposed to free chlorine or copper ions. A chlorine solution was added to inoculated water to obtain an initial free-chlorine concentration of $2 \text{ mg Cl}_2 \text{ L}^{-1}$. Free-chlorine concentrations were measured by the N,N-diethyl-p-phenylenediamine method using a DR5000

spectrophotometer (HACH). Sodium thiosulfate (1%) was added to neutralize chlorine prior to conducting microbiological analysis. Copper sulfate was used as the source of copper ions and was added to the water prior to inoculation (CuSO_4 , final concentration $0.25 \text{ mg Cu}^{2+} \text{ L}^{-1}$). Copper ions were chelated after 24 h by the addition of diethyldithiocarbamate (Moritz, 2011). All samples were mixed thoroughly and divided to perform selected analytical methods.

For the enzyme-based assay and culture methods comparison in absence of free chlorine and copper ions, serial dilutions of an early exponential phase bacterial suspension were prepared ($1\text{--}10^6 \text{ cells mL}^{-1}$).

Microbiological analysis

Culture was performed according to International Standards Organization method 16266:2006 for *P. aeruginosa* detection and enumeration in water (International Standards Organization, 2006). Briefly, three dilutions were done in duplicate for each sample, filtered on a 0.45 lm pore size, 47 mm diameter mixed cellulose ester membrane. The filters were deposited on cetrimide-nalidixic acid agar plates [45.3 g L^{-1} of Cetrimide Selective Agar (Remel, Lenexa, KS), 10 mL L^{-1} glycerol (Fisher, Fair Lawn, NJ), 0.015 g L^{-1} nalidixic acid (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)] and incubated at 37.5°C for 24 h before enumeration. Detection was also performed on two sample dilutions using the Pseudalert/Quanti-Tray2000 (IDEXX, Chicago, IL) according to the manu-facturer's instructions. Viable and total cell counts were determined using LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit (Molecular Probes, Eugene, OR; Boulos et al., 1999). This kit differentiates viable from dead cells using mem-brane integrity criteria. Total cells are defined as the sum of viable (green) and dead (red) cells (Fig. 1). Briefly, 1 mL of sample or dilution in 0.85% sterile saline solu-tion was mixed with 3 mL of stain (propidium iodide and SYTO9), incubated in the dark for 15 min and filtered on black 0.2 lm pore diameter, 25 mm diameter polycar-bonate filter (Millipore, Bedford, MA). Enumeration was done at 1000-fold magnification, with an epifluorescence microscope (Olympus, Tokyo, Japan). VBNC cells were estimated as the difference between the viable and cultur-able cells.

Real-time qPCR amplification

A volume of 25 mL was filtered through a 0.45 lm pore diameter, 47 mm diameter mixed cellulose ester mem-brane for DNA extraction performed directly on filters using the bead beating method adapted from Yu & Mohn (1999). Briefly, the filter was inserted into an extraction

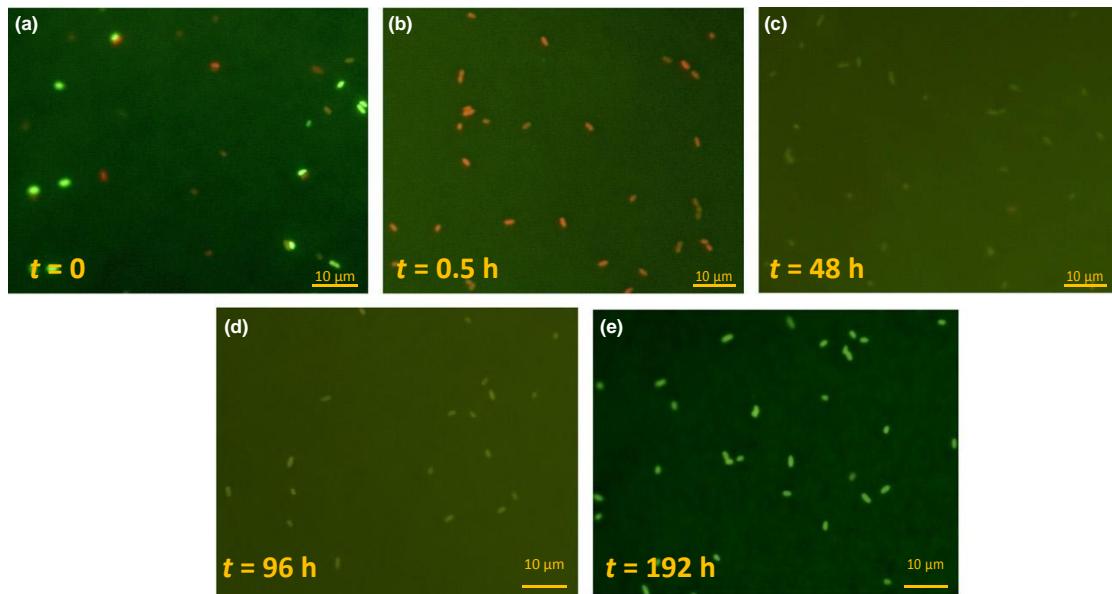


Fig. 1. LIVE/DEAD stained *Pseudomonas aeruginosa* PA14 in buffered sterile water (pH 7.3) for various contact times after chlorination illustrating the transient cell marking observed: green prior to chlorination (a), red at $t = 0.5$ h (b), faded yellow at $t = 48$ h (c), light green $t = 96$ h (d) and green at $t = 192$ h (e). Green cells represent viable cells and red cells represent dead cells.

tube (Lysing Matrix A; MP Biomedicals, Solon, OH). Extraction buffer containing 50 mM Tris-HCl (pH 8), 5 mM EDTA (pH 8), 3% sodium dodecyl sulfate and RNase (20 lg mL⁻¹; Invitrogen, Carlsbad, CA) was added to each tube prior to the bead beating step performed on a FastPrep-24 (MP Biomedicals), followed by ammonium acetate precipitation (2M; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) and successive cold 70% ethanol washes. Quantification by quantitative polymerase chain reaction (qPCR) was performed on *gyrB* gene, using primers and probes previously described (Lee et al., 2011). The *gyrB* gene was chosen for its specificity and sensitivity for *P. aeruginosa*. The following protocol was applied: 10 min initial denaturation at 95 °C followed by 50 cycles with denaturation at 95 °C for 30 s, annealing and elongation at 60 °C for 90 s (Corbett Rotor-Gene 6000, San Francisco, CA). Final reaction volume (20 lL) included 5 lL of DNA, 29 Uni-versal MasterMix (Life Technologies, Foster City, CA) and TaqMan Exogenous Internal Positive Control Reagent (Applied Biosystems, Austin, TX).

Results and discussion

The objective was to measure the impact of chlorine-based disinfectant and copper-containing water on the detection of *P. aeruginosa* under environmental conditions and to document its culturability recovery after

those stressors were removed. Suspensions of *P. aeruginosa* cells were monitored for up to 8 days, with free chlorine and copper ions present only during the first 24 h.

Effect of chlorine stress on *P. aeruginosa* culturability

A representative concentration of free chlorine found in drinking water distribution systems was selected to reach a target concentration of < 0.1 mg Cl₂ L⁻¹ after 24 h. Figure 2 shows the loss of culturability (final to initial CFU mL⁻¹, N/N₀) of *P. aeruginosa* as a function of exposure to free chlorine expressed as the product of concentration and contact time (also expressed as C_t in the literature) observed during the first 24 h. Similar data at lower exposure to chlorine values reported by Xue et al. (2013) are also presented. Increased initial rates of apparent inactivation of culturable *P. aeruginosa* by chlorine have been documented in batch and chemostat experiments (Behnke et al., 2011; Xue et al., 2013) showing large reductions (3.5–6 log) at initial free chlorine dosage of ≤ 1 mg Cl₂ L⁻¹. Results presented in Fig. 2 show a trend of inactivation similar to the one obtained by Xue et al. (2013). The loss of culturability observed in this study increased with exposure to free chlorine (product of concentration and contact time) resulting from low chlorine concentrations maintained over long periods of

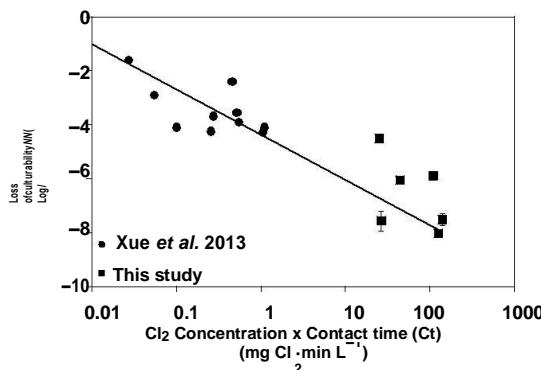


Fig. 2. Loss of culturability for *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (Xue et al., 2013) and PA14 (this study) assessed by culture method (final to initial CFU mL^{-1} ratio, N/N_0) as a function of free-chlorine concentration ($\text{mg Cl}_2 \text{ L}^{-1}$) and contact time (min) product expressed as Ct . Error bars for this study indicate standard deviation.

time (24 h). These chlorination conditions are representative of those found in drinking water systems of large buildings.

Cell inactivation (final to initial measured cell count ratio, N/N_0) as a function of time is shown for the various detection methods in Fig. 3a. Despite complete loss of culturability during the exposure to free chlorine and a poor nutrient environment (phosphate-buffered water), recovery of culturability after an additional delay of 24 h following stress interruption was observed with both CFU-based and enzyme-based detection methods. A decrease in viable counts was also observed during exposure to chlorine (Fig. 3a), indicating membrane injury for a large portion of cells. After the onset of chlorination, the majority of cells labeled with LIVE/DEAD stain (total and viable) showed poor fluorescence in the presence of free chlorine, an observation in agreement with the documented loss of DAPI fluorescence after chlorination at 5 $\text{mg Cl}_2 \text{ L}^{-1}$ (Saby et al., 1997). Poor fluorescence was attributed to the inability of the dye to bind to chlorine-modified DNA or to physical damage to the DNA. However, as chlorine concentrations declined over time, a transition in cell marking was observed, from typical red-stained associated with membrane permeabilization to orange and faded yellow before reverting to light green (Fig. 1). The dye combination of SYTO9 and PI can detect both inner and outer membrane permeabilization in Gram-negative bacteria as detected by flow cytometry, and outer membrane damage can be reversible (Berney et al., 2007). According to Xue et al. (2013), similar intermediate states of binding after chlorination are an indication of reversible cell injury (i.e. enzyme activity or functional group deformation) as opposed to lethal

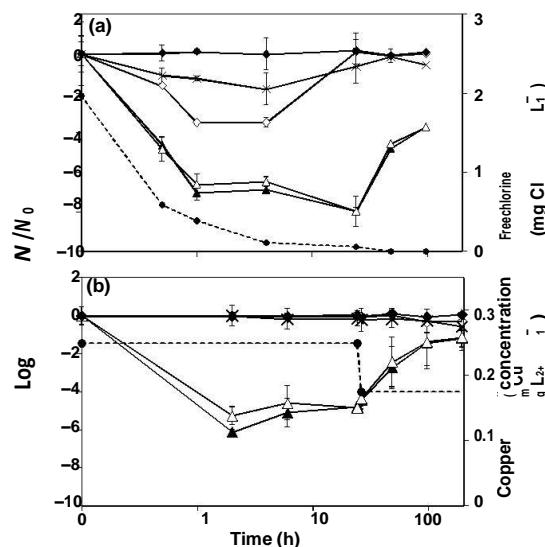


Fig. 3. Cell survival of *Pseudomonas aeruginosa* PA14 in buffered sterile water (pH 7.3) as a function of time elapsed after application of 2.0 $\text{mg Cl}_2 \text{ L}^{-1}$ of free chlorine (a) and 4 IM copper ions (b). Cell survival is expressed as the logarithm of N/N_0 , where N_0 is the initial cell count and N is the cell count at sampling time. Enumeration was carried out by culture (\blacktriangle , CFU mL^{-1}), enzyme-based assay (\bullet , MPN mL^{-1}), qPCR (\times , genomic units L^{-1}) and LIVE/DEAD staining (\lozenge , viable cells and \blacklozenge , total cells). Viable cells are defined as cells with membrane integrity and total cells as the sum of viable and dead cells. Error bars indicate standard deviation ($n = 3$). Free-chlorine concentration decay (\bullet) and copper ion concentration (\circ) are presented on the secondary y-axis. Copper ions were chelated with diethyldithiocarbamate at $t = 24 \text{ h}$ (b).

membrane damage. Although it is not possible to confirm the state of the cells showing intermediate staining, the observed trends in viable and cultivable cells provide evidence that most cells can survive and regrow rapidly after the dissipation of free chlorine. This is clearly observed for VBNC cells after 24 h, corresponding to the loss of significant concentration in free chlorine (Fig. 3a). qPCR results show a decrease within the first hours of contact time with free chlorine, but revert to levels comparable to total cell counts obtained by LIVE/DEAD staining after 24 h.

These results are highly relevant to conditions prevailing in drinking water distribution systems. The levelling off of the inactivation curves observed in disinfection studies show that a significant fraction of suspended bacteria can breakthrough primary disinfection and enter the distribution system (Behnke et al., 2011; Xue et al., 2013). Secondary disinfection conditions are not sufficient to completely inactivate suspended or clustered cells as

free-chlorine concentrations decline progressively with water age (Rossman et al., 1994). Internal plumbing in large buildings offer highly favorable conditions for biofilm development because of the large surface area provided by small diameter pipes and corrosion, long residence times including dead-end sections and disinfectant consumption (Pr-evost et al., 1997). A significant fraction of chlorine-injured cells in the present study are still viable but unlikely to be detected by standard culture methods.

Effect of copper ion stress on *P. aeruginosa* culturability

The current World Health Organization (2008) guideline value for copper concentrations in drinking water is set at 2 mg Cu²⁺ L⁻¹. In the United States, the Environmental Protection Agency fixed the maximum contaminant level goal for copper at 1.3 mg Cu²⁺ L⁻¹ (United States Environmental Protection Agency, 2009). California has the lowest recommended level with an established public health goal of 0.3 mg L⁻¹ (California Environmental Protection Agency et al., 2008). In the present study, copper stress was evaluated by adding 0.25 mg Cu²⁺ L⁻¹, representative of concentrations found in internal plumbing of large buildings in the study area (data not shown) and meeting recommended levels in drinking water. *Pseudomonas aeruginosa* counts dropped from 3.9 10⁷ to 2.3 9 10¹ CFU mL⁻¹ (6.1 log) in culture and from 2.9 9 10⁷ to 1.6 9 10² Most Probable Number (MPN) mL⁻¹ (4.7 log) as measured by the enzyme-based method within 2 h of exposure to copper ions (Fig. 3b). These results agree with prior reports of steep decline in culturable *P. aeruginosa* and persistence of a resistant sub-population at lower copper ion levels (Teitzel & Parsek, 2003; Huang et al., 2008; Dwidjosiswojo et al., 2011). Unlike free chlorine, ionic copper did not affect viability, and no transition period was observed with fluorescent staining (suggesting the absence of significant membrane permeabilization, data not shown). Results obtained by qPCR were constant throughout the experiment and comparable with total cell count. Copper ions were neutralized after 24 h of contact time by adding a chelating agent (100 µM diethyldithiocarbamate) that was demonstrated to have no inhibitory impact (data not shown). The quenching resulted in recovery of culturability within 3 days, with cell densities approaching initial concentrations. No measurable changes in total or viable cell counts were noted, minimizing the importance of cell multiplication in the apparent recovery of culturability of *P. aeruginosa* although some contribution from surviving cells is possible. These results are in agreement with a previous study documenting the reversible inhibition of

P. aeruginosa culturability by copper ions (Dwidjosiswojo et al., 2011). Slightly higher losses of culturable cells (from 10⁶ CFU mL⁻¹ to below detection limit) than those observed here were reported following exposure of an environmental strain of *P. aeruginosa* to 0.635 mg Cu²⁺ L⁻¹ copper, with complete recovery in 14 days (Dwidjosiswojo et al., 2011).

These results have significant implications for monitoring *P. aeruginosa* in drinking water of health care establishments because of the presence of copper in internal plumbing. While newer copper piping might inhibit *P. aeruginosa* attachment initially, passivation of the material results in biofilm colonization after 1 or 2 years of utilization (Critchley et al., 2001; van der Kooij et al., 2005). Although the main source of copper in water is piping, brass present in valves, faucets, meters, and fittings can also leach copper in water during stagnation. In spite of the impact of brass elements, environmental conditions in the volume of water contained in the tap and its connecting pipe (< 50 mL) are most favorable to culturable state. Indeed, copper concentrations will be lower than in the connecting copper piping and free chlorine will be depleted. Therefore, the selection of sampling volumes carries direct implications for culturability and the interpretation of monitoring results. Recommended and typical sampling volumes vary between 50 and 500 mL (Ferroni et al., 1998; Trautmann et al., 2001; Chaberny & Gastmeier, 2004; Department of Health, 2013), large enough to include water from the connecting pipe containing potentially high copper concentration. Cells from the initial stagnant volume would then be exposed to enough copper to enter a VBNC state, potentially leading to cell count underestimation when using standard culture methods. Bacteria collected in copper-rich water continue to be exposed to this inhibitor until processing for detection (up to 24 h), unless sufficient quencher or chelating agent are added.

Impact of free chlorine and copper ion stresses on enzyme-based detection compared to culture method

Pseudalert is a new enzyme-based assay used to provide a quick response detection of *P. aeruginosa* currently applied to pools, spas, and bottled water. It is based on the same platform as Colilert, a US Environmental Protection Agency-approved kit used for the detection of *Escherichia coli*. The enzyme-based assay for *P. aeruginosa* offers an attractive alternative to culture and is currently undergoing validation for monitoring of *P. aeruginosa* at water points of use in healthcare establishments. Technical data from the manufacturer and recent publications provide information on the positive correlation with

culture enumerations in pool samples and bottled water (Idexx Laboratories, 2010a, b; Mannisto, 2012; Semproni et al., 2014). However, the influence of direct exposure to free chlorine or copper ions stress on the performance of the test has not been documented in drinking water on a wide range of cell concentrations.

Figure 4 shows that paired measurements for a control culture in early exponential phase using direct culturing and the enzyme-based methods are highly correlated ($R^2 = 0.99$, $n = 24$) as confirmed by the 95% prediction interval (Fig. S1a). This correlation is observed over a wide range of concentrations and remains in agreement with the previously published dataset on pool and spa water samples ($R^2 = 0.95$, $n = 14$) established with lower detected concentrations of *P. aeruginosa* (Idexx Laboratories, 2010a). Overall, results obtained by the enzyme-based assay led to slightly higher estimates than direct culturing with a positive bias of 7% (Fig. 4).

Figure 5 presents paired measurements by enzyme-based assay and culture methods on stressed cells. Exposure to free chlorine did not modify the correlation observed in the absence of stress ($R^2 = 0.99$; Fig 5). The 95% prediction intervals on the log-transformed data without a forced intercept confirms that chlorine exposure does not modify the correlation between the enzyme-based and the culture results (Fig. S1a and b). However, for copper-ion-induced stress conditions, an apparent scatter from the regression line is noted (Fig. 5), and the 95% prediction interval on the log-transformed data without a forced intercept clearly shows the poor

correlation in the presence of $0.25 \text{ mg Cu}^{2+} \text{ mL}^{-1}$ (Fig. S1c). As no interference with the reagent was observed (data not shown), the increased response of the enzymatic assay may be attributed to the interference of

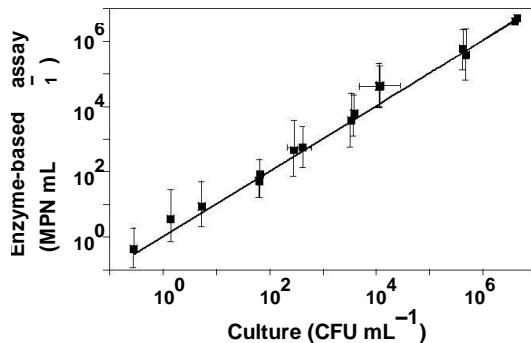


Fig. 4. *Pseudomonas aeruginosa* PA14 cells concentrations suspended in buffered sterile water measured by enzyme-based assay in MPN mL^{-1} and standard culture methods in CFU mL^{-1} ($n = 24$; $y = 1.07x$; $R^2 = 0.995$). Error bars indicate 95% confidence range for MPN and standard deviation for culture.

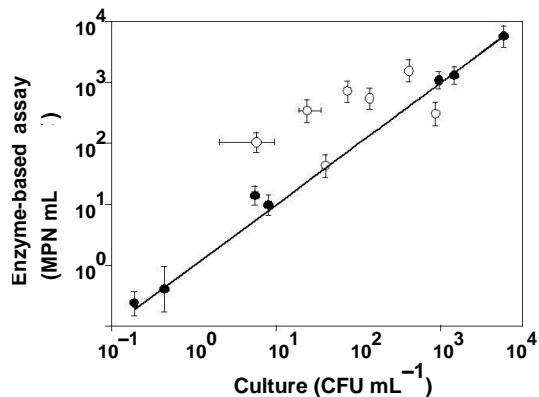


Fig. 5. *Pseudomonas aeruginosa* PA14 cells concentrations measured by the enzyme-based assay in MPN mL^{-1} and standard culture methods in CFU mL^{-1} in presence of 2 mg L^{-1} initial chlorine concentration (●, $n = 7$; $y = 0.99x$; $R^2 = 0.99$) and 4 IM copper (○, $n = 7$).

copper ions with the enzymatic hydrolysis of the substrate, possibly because of the enhanced production of the targeted enzyme (Teitzel et al., 2006).

Implications for environmental monitoring

Culture-based methods are most commonly prescribed to monitor *P. aeruginosa*, and standards and guidelines in drinking water and clinical settings are still almost entirely expressed in CFU mL^{-1} . Results obtained in this study demonstrate the presence of viable *P. aeruginosa* cells in some water samples that would not be detected by standard plate count culturing or by an enzyme-based assay due to prior exposure to free chlorine or copper ion stress, a common situation within internal plumbing. Residual chlorine is often detected in municipal cold water and standard sampling protocols recommend the addition of sodium thiosulfate to neutralize residual chlorine upon sample collection (American Public Health Association et al., 2012). Even with neutralization, bacteria previously exposed to free chlorine may not fully recover culturability before the start of culture, as samples are processed within 24 h of sampling. Resulting counts may then be an underestimation, providing a false sense of security. The comparison of results from culture and the enzymatic assay suggest a greater sensitivity of the enzymatic assay that, coupled with the quicker response time (< 26 h), may provide additional surveillance value and contribute to prevention.

Results of this study reveal the presence of a large proportion of VBNC cells in the presence of common environmental stressors such as free chlorine and copper ions. It was shown that *P. aeruginosa* exposed to chlorine

and copper ions are unlikely to be measured by standard culture methods, or even newer quicker response methods based on enzymatic reactions. This raises the question of the sanitary significance of the presence of *P. aeruginosa* in a VBNC state. Although some cells in the VBNC state are avirulent, the potential for VBNC cells to become infectious once resuscitated has been clearly documented (Oliver, 2010; Dwidjoswoyo et al., 2011). Conditions and time lag for such resuscitation vary greatly, and the time of recovery in nutrient-rich environments such as a sink drain or susceptible host is poorly documented. As disinfectant residuals are not stable or are often absent in internal plumbing, VBNC cells could regain culturability and infectivity between sampling events. Copper ion concentrations in large building drinking water systems can reach and surpass 0.25 mg L^{-1} . This is especially the case in large buildings such as hospitals, where copper is a commonly used pipe material and stagnation between uses can lead to elevated copper concentrations. These results also highlight the need to revisit the evaluation of Cu–Ag based-disinfection methods efficacy. Moreover, they highlight the importance of using an appropriate monitoring protocol, including sampling volume, sample treatment and analytical method to assess the risks to which patients are directly or indirectly exposed.

On the other hand, the use of qPCR as routine monitoring in hospitals is still infrequent. The main drawback cited against its wide use is its inability to distinguish between viable and dead cells, as all intact DNA can be amplified. Nevertheless, qPCR can still be used as a monitoring tool, especially to interpret changes to the baseline values in a drinking water system. Clearly, an increase in the qPCR signal indicates cell multiplication and proactive action could be taken to resolve the issue before it is detected by culture methods. In critical situation, this approach could complement culture and enzymatic methods and help reduce the risk associated with the presence of *P. aeruginosa* in water. Viability PCR is being developed, where an intercalating dye prevents the amplification of DNA in membrane compromised dead cells, but it still suffers from practical limitations. Given the demonstration of the potential of VBNC cells to regain virulence, viability PCR holds great promise for future monitoring improvements.

Acknowledgements

Authors would like to thank Jacinthe Mailly, Julie Philibert and M_elanie Rivard for their technical support. This work was funded by the NSERC Industrial Drinking Water Chair of Ecole Polytechnique and Industrial Partners. ED holds a Canada Research Chair.

References

- American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA) & Water Environment Federation (WEF) (2012) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. American Public Health Association, Washington, DC.
- Behnke S, Parker AE, Woodall D & Camper AK (2011) Comparing the chlorine disinfection of detached biofilm clusters with sessile biofilms and planktonic cells in single and dual species cultures. *Appl Environ Microbiol* 77: 7176–7184.
- Berney M, Hammes F, Bosshard F, Weilenmann HU & Egli T (2007) Assessment and interpretation of bacterial viability by using the LIVE/DEAD BacLight kit in combination with flow cytometry. *Appl Environ Microbiol* 73: 3283–3290.
- Boulos L, Pr_evest M, Barbeau B, Coallier J & Desjardins R (1999) LIVE/DEAD® BacLight™: application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. *J Microbiol Methods* 37: 77–86.
- California Environmental Protection Agency, Pesticide and Environmental Toxicology Branch & Office of Environmental Health Hazard Assessment (2008) Public Health Goals for Copper in Drinking Water. California Environmental Protection Agency, Pesticide and Environmental Toxicology Branch & Office of Environmental Health Hazard Assessment, California.
- Chaberny IF & Gastmeier P (2004) Should electronic faucets be recommended in hospitals? *Infect Control Hosp Epidemiol* 25: 997–1000.
- Critchley MM, Cromar NJ, McClure N & Fallowfield HJ (2001) Biofilms and microbially influenced cuprosolvency in domestic copper plumbing systems. *J Appl Microbiol* 91: 646–651.
- Department of Health (DH), Government of Great Britain (2013) Water systems: HTM 04-01: Addendum. *Pseudomonas aeruginosa* – advice for augmented care units.
- Durojaiye OC, Carbarns N, Murray S & Majumdar S (2011) Outbreak of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in an intensive care unit. *J Hosp Infect* 78: 154–155.
- Dwidjoswoyo Z, Richard J, Moritz MM, Dopp E, Flemming H-C & Wingender J (2011) Influence of copper ions on the viability and cytotoxicity of *Pseudomonas aeruginosa* under conditions relevant to drinking water environments. *Int J Hyg Environ Health* 214: 485–492.
- Ehrhardt D, Terashita D & English T (2006) An outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* in neonatal intensive care unit, Los Angeles County, 2006. Acute communicable disease control program, Special Studies Report.
- Elguindi J, Wagner J & Rensing C (2009) Genes involved in copper resistance influence survival of *Pseudomonas aeruginosa* on copper surfaces. *J Appl Microbiol* 106: 1448–1455.
- Emerson J, Rosenfeld M, McNamara S, Ramsey BW & Gibson RL (2002) *Pseudomonas aeruginosa* and other predictors of mortality and morbidity in young children with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 34: 91–100.

- Exner M (2012) Wasser als Infektionsquelle: Leitungswasser: Klar und sauber? *Heilberufe* 64: 24–27.
- Ferroni A, Nguyen L, Pron B, Quesne G, Brusset M-C & Berche P (1998) Outbreak of nosocomial urinary tract infections due to *Pseudomonas aeruginosa* in a paediatric surgical unit associated with tap-water contamination. *J Hosp Infect* 39: 301–307.
- Harrison JJ, Turner RJ & Ceri H (2005) Persister cells, the biofilm matrix and tolerance to metal cations in biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol* 7: 981–994.
- Hota S, Hirji Z, Stockton K, Lemieux C, Dedier H, Wolfaardt G & Gardam MA (2009) Outbreak of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* colonization and infection secondary to imperfect intensive care unit room design. *Infect Control Hosp Epidemiol* 30: 25–33.
- Huang H-I, Shih H-Y, Lee C-M, Yang TC, Lay J-J & Lin YE (2008) In vitro efficacy of copper and silver ions in eradicating *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* and *Acinetobacter baumannii*: implications for on-site disinfection for hospital infection control. *Water Res* 42: 73–80.
- Idexx Laboratories (2010a) Comparison of the performance of the IDEXX Pseudalert^{*} test against the EN ISO 16266:2008 method at recovering confirmed *Pseudomonas aeruginosa* from pool/spa water samples.
- Idexx Laboratories (2010b) Comparison of the performance of the IDEXX Pseudalert test against SM 9213E at recovering confirmed *Pseudomonas aeruginosa* from pool/spa water samples.
- International Standards Organization (2006) ISO 16266:2006 Water quality – Detection and enumeration of *Pseudomonas aeruginosa* – Method by membrane filtration.
- Kerr KG & Snelling AM (2009) *Pseudomonas aeruginosa*: a formidable and ever-present adversary. *J Hosp Infect* 73: 338–344.
- Lee DG, Urbach JM, Wu G et al. (2006) Genomic analysis reveals that *Pseudomonas aeruginosa* virulence is combinatorial. *Genome Biol* 7: R90.
- Lee CS, Wetzel K, Buckley T, Wozniak D & Lee J (2011) Rapid and sensitive detection of *Pseudomonas aeruginosa* in chlorinated water and aerosols targeting *gyrB* gene using real-time PCR. *J Appl Microbiol* 111: 893–903.
- Mannisto A (2012) Applicability of rapid methods for controlling *Pseudomonas* and chlorine in swimming pool water. Undergraduate Thesis, Satakunta University of Applied Sciences, Finland.
- Moritz MM (2011) Integration of hygienically relevant bacteria in drinking water biofilms grown on domestic plumbing materials. PhD Thesis, Universität Duisburg-Essen, Germany.
- Moritz MM, Flemming HC & Wingender J (2010) Integration of *Pseudomonas aeruginosa* and *Legionella pneumophila* in drinking water biofilms grown on domestic plumbing materials. *Int J Hyg Environ Health* 213: 190–197.
- Oliver JD (2005) The viable but nonculturable state in bacteria. *J Microbiol* 43: 93–100.
- Oliver JD (2010) Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 34: 415–425.
- Pier GB (2012) The challenges and promises of new therapies for cystic fibrosis. *J Exp Med* 209: 1235–1239.
- Prévost M, Rompré A, Baribeau H, Coallier J & Lafrance P (1997) Service lines: their effect on microbiological quality. *J Am Water Works Assoc* 89: 78–91.
- Rosman LA, Clark RM & Grayman WM (1994) Modeling chlorine residuals in drinking-water distribution systems. *J Environ Eng* 120: 803–820.
- Saby S, Siblette I, Mathieu L, Paquin JL & Block J-C (1997) Influence of water chlorination on the counting of bacteria with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole). *Appl Environ Microbiol* 63: 1564–1569.
- Schneider H, Gegnath G, Hogardt M, Kramer A, Durken M, Schrotten H & Tenenbaum T (2012) *Pseudomonas aeruginosa* outbreak in a pediatric oncology care unit caused by an errant water jet into contaminated siphons. *Pediatr Infect Dis J* 31: 648–650.
- Semproni M, Briancesco R, Giampaoli S, Gianfranceschi G, Paradiso R, Romano Spica V, Valeriani F & Bonadonna L (2014) Confronto di metodi culturali per il rilevamento di *Pseudomonas aeruginosa*: il metodo di riferimento UNI EN ISO 16266 e il metodo alternativo Pseudalert⁺. *Ann Ig* 26: 110–118.
- Teitzel GM & Parsek MR (2003) Heavy metal resistance of biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol* 69: 2313–2320.
- Teitzel GM, Geddie A, De Long SK, Kirisits MJ, Whiteley M & Parsek MR (2006) Survival and growth in the presence of elevated copper: transcriptional profiling of copper-stressed *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 188: 7242–7256.
- Trautmann M, Michalsky T, Wiedeck H, Radosavljevic V & Ruhnke M (2001) Tap water colonization with *Pseudomonas aeruginosa* in a surgical intensive care unit (ICU) and relation to *Pseudomonas* infections of ICU patients. *Infect Control Hosp Epidemiol* 22: 49–52.
- Trautmann M, Lepper PM & Haller M (2005) Ecology of *Pseudomonas aeruginosa* in the intensive care unit and the evolving role of water outlets as a reservoir of the organism. *Am J Infect Control* 33: S41–S49.
- United States Environmental Protection Agency (USEPA) (2009) National Recommended Water Quality Criteria. Office of Water, Office of Science and Technology (4304T), Washington, DC.
- van der Kooij D, Veenendaal HR & Scheffer WJH (2005) Biofilm formation and multiplication of *Legionella* in a model warm water system with pipes of copper, stainless steel and cross-linked polyethylene. *Water Res* 39: 2789–2798.
- Vianelli N, Giannini MB, Quartì C et al. (2006) Resolution of a *Pseudomonas aeruginosa* outbreak in a hematology unit with the use of disposable sterile water filters. *Haematologica* 91: 983–985.

- Weinstein RA, Gaynes R, Edwards JR & System NNIS (2005) Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli. *Clin Infect Dis* 41: 848–854.
- World Health Organization (WHO) (2008) *Guidelines for Drinking Water-Quality*, 3rd edn incorporating the First and Second addenda Edition (Volume 1). Recommendations. WHO, Geneva, Switzerland.
- Xu H-S, Roberts N, Singleton FL, Attwell RW, Grimes DJ & Colwell RR (1982) Survival and viability of Nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment. *Microb Ecol* 8: 313–323.
- Xue Z, Hessler CM, Panmanee W, Hassett DJ & Seo Y (2013) *Pseudomonas aeruginosa* inactivation mechanism is affected by capsular extracellular polymeric substances reactivity with chlorine and monochloramine. *FEMS Microbiol Ecol* 83: 101–111.
- Yapicioglu H, Gokmen TG, Yildizdas D et al. (2011) *Pseudomonas aeruginosa* infections due to electronic faucets in a neonatal intensive care unit. *J Paediatr Child Health* 57: 157–164.
- Yu Z & Mohn WW (1999) Killing two birds with one stone: simultaneous extraction of DNA and RNA from activated sludge biomass. *Can J Microbiol* 45: 269–272.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Fig. S1. Log-transformed data for paired measurements using culture and the enzyme-based assay in absence of chlorine or copper, same data as presented in Fig. 2 (a), in presence of free chlorine (b) and copper ions (c), same data as presented in Fig. 5.

ANNEXE 2 Résultats microbiologiques de la campagne d'échantillonnage

Tableau A2.1 Hôpital 1 - Résultats des analyses microbiologiques

ID	Type de robinet	Drain colonisé	Eau CFU/100mL	Détection enzymatique (MPN/100mL)
101	RE	1	<1	<1
102	RC	1	<1	<1
103	RC	1	<1	<1
104	RE	1	<1	<1
105	RC	1	<1	<1
106	RC	1	<1	<1
107	RE	1	<1	<1
108	RC	1	<1	<1
109	RE	1	<1	<1
110	RC	1	<1	<1
111	RE	1	28	435,2
112	RC	1	<1	<1
113	RE	1	<1	<1
114	RC	1	<1	<1
115	pédale	1	<1	<1
116	RE	1	<1	<1
117	RC	1	<1	<1
118	RC	0	<1	<1
119	RE	1	<1	<1
120	Bouton pression	1	<1	<1
121	RC	0	<1	<1
122	RE	1	<1	<1
123	RE	1	<1	<1
124	RC	0	<1	<1
125	RC	1	<1	<1
128	RE	1	<1	10
129	RE	0	<1	<1
130	RE	1	<1	<1
131	RC	0	<1	<1
132	RE	0	<1	>2419,6

Tableau A2.1 Hôpital 1 - Résultats des analyses microbiologiques (suite)

ID	Type de robinet	Drain colonisé	Eau CFU/100mL	Détection enzymatique (MPN/100mL)
133	RE	1	<1	<1
134	RE	0	<1	<1
135	RE	0	<1	<1
136	RE	0	<1	<1
137	RC	0	<1	<1
138	RC	0	<1	<1
139	RE	0	<1	2419,6
140	RE	1	<1	<1
141	RE	1	<1	<1
142	RC	0	<1	<1
143	RE	0	<1	<1
144	RC	0	<1	<1
145	RE	0	<1	<1
146	RC	0	<1	<1
147	RE	1	<1	<1
148	RE	1	<1	<1
149	RC	1	<1	<1
150	RC	1	<1	<1
151	RC	1	<1	<1
152	RC	0	<1	<1
153	RC	0	<1	<1
154	RC	1	<1	<1
155	RE	0	<1	<1
156	RE	0	<1	<1
157	RE	1	<1	<1
158	RE	1	<1	<1
159	RE	1	<1	<1
160	RE	0	<1	<1
161	RE	0	<1	<1
162	RC	0	<1	>2419,6
163	RC	1	<1	<1
164	RC	1	<1	<1
165	RC	1	<1	<1
166	RC	1	<1	<1
167	RC	1	1	1
168	RE	1	<1	<1

Tableau A2.1 Hôpital 1 - Résultats des analyses microbiologiques (suite)

ID	Type de robinet	Drain colonisé	Eau CFU/100mL	Détection enzymatique (MPN/100mL)
169	RE	1	<1	<1
170	RE	1	<1	<1

Tableau A2.2 Hôpital 2 - Résultats des analyses microbiologiques

ID	Type de robinet	Drain colonisé	Eau CFU/100mL	Détection enzymatique (MPN/100mL)
202	RE	0	2	<1
203	RE	0	<1	<1
204	RE	1	<1	<1
205	RE	0	<1	<1
206	RE	1	<1	<1
207	RC	0	>300	2419,6
208	RE(wTaside)	0	<1	1553,1
209	RE(wTaside)	0	<1	<1
210	RE(wTaside)	0	<1	<1
211	RE(wTaside)	0	<1	>2419,6
212	RE(wTaside)	0	<1	<1
213	RC	1	<1	<1
214	RE	1	<1	<1
215	RE	0	<1	<1
216	RC	1	<1	2419,6
217	RC	0	<1	45,3
218	RE	0	<1	<1
219	RE	0	<1	<1
220	RE	0	<1	<1
221	RE	0	<1	<1
222	RE	0	<1	<1
224	RE	0	<1	<1
225	RE	1	<1	<1
226	RC	0	<1	<1
228	RC	0	<1	<1
229	RE	1	<1	<1

Tableau A2.2 Hôpital 2 - Résultats des analyses microbiologiques (suite)

ID	Type de robinet	Drain colonisé	Eau CFU/100mL	Détection enzymatique (MPN/100mL)
232	RC	0	<1	<1
234	RE	1	<1	<1
235	RE	0	<1	<1
236	RC	1	<1	<1
237	Pédale	1	<1	<1
238	Pédale	1	<1	<1
239	Pédale	0	<1	<1
240	RC	1	<1	<1
241	RC	0	<1	<1
242	RC	1	<1	<1
243	Pédale	1	<1	<1
244	RE	0	<1	<1
245	RC	1	<1	<1
246	RC	1	<1	<1
247	RC	0	<1	<1
248	RC	1	<1	<1
249	Pédale	0	2	2
250	RC	0	<1	<1
251	Pédale	1	<1	<1
252	Pédale	0	<1	<1
253	RE	0	<1	<1
254	RE	1	<1	<1
255	RE	0	<1	<1
256	RE	1	<1	<1
257	RE	1	<1	<1
258	RC	0	<1	<1
259	Pédale	1	<1	<1
260	RC	1	<1	<1
261	Pédale	0	<1	>2419,6
262	RC	1	<1	<1
263	RC	0	<1	<1
264	RC	0	<1	1119,9
265	Pédale	0	<1	2419,6
266	RC	0	<1	<1

Tableau A2.3 Hôpital 3 - Résultats des analyses microbiologiques

ID	Type de robinet	Drain colonisé	Eau CFU/100mL	Détection enzymatique (MPN/100mL)
301	Pédale	1	1.5	6,3
302	RE	0	<1	<1
303	RC	1	<1	6
304	RE	0	<1	<1
305	RC	1	<1	<1
306	RE	1	97.5	307,6
307	RC	1	<1	<1
308	RE	0	<1	<1
309	RC	1	<1	10
310	RE(wTaside)	1	<1	<1
312	RE(wTaside)	1	<1	<1
313	RE(wTaside)	1	<1	1732,9
314	RE(wTaside)	1	<1	1
315	RE	0	<1	<1
316	RE	1	<1	<1
317	RC	1	<1	<1
318	RE	0	<1	1
319	RC	1	<1	<1
320	RE	1	<1	<1
321	RE	1	<1	<1
322	RC	0	<1	<1
323	RC	0	<1	<1
324	RC	1	<1	1
325	RE	0	<1	1732,9
326	RE	0	<1	1986,3
327	RE	0	<1	1732,9
328	RE	1	<1	1
329	RC	0	<1	<1
330	RC	1	<1	<1
331	RC	0	<1	<1
332	RC	1	<1	<1
333	RE	0	<1	<1
334	RC	1	<1	<1
335	RC	1	<1	<1
336	RC	1	<1	<1

Tableau A2.3 Hôpital 3 - Résultats des analyses microbiologiques (suite)

ID	Type de robinet	Drain colonisé	Eau CFU/100mL	Détection enzymatique (MPN/100mL)
337	RE	1	<1	<1
338	RE	1	<1	<1
339	RC	0	<1	<1
340	RC	1	<1	2419,6
341	RE	0	<1	<1
342	RE	1	<1	<1
343	RE	1	<1	<1
344	RE(wTaside)	0	<1	<1
345	RE(wTaside)	1	<1	<1
346	RE(wTaside)	1	<1	<1
347	RE	0	<1	<1
348	RE	0	<1	2419,6
349	RE	0	<1	1732,9
350	RE	0	<1	2419,6
351	RC	1	<1	<1
352	RC	0	<1	<1
353	RE(wTaside)	1	<1	<1

Tableau A2.4 Hôpital 4 - Résultats des analyses microbiologiques

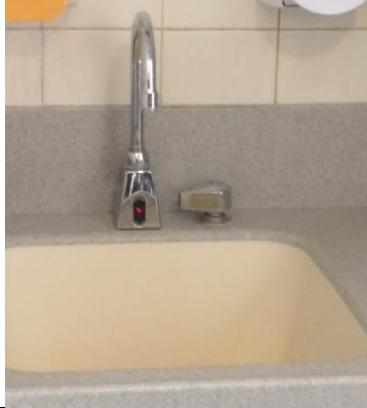
ID	Type de robinet	Drain colonisé	Eau CFU/100mL	Détection enzymatique (MPN/100mL)
401	RC	0	<1	<1
402	RC	0	<1	>2419,6
403	RC	0	<1	>2419,6
404	RE	0	18,5	<1
405	RE	0	5,5	<1
406	RE	1	<1	<1
407	RC	0	<1	<1
408	RC	1	<1	8,6
409	RC	1	<1	<1
410	RC	0	<1	<1

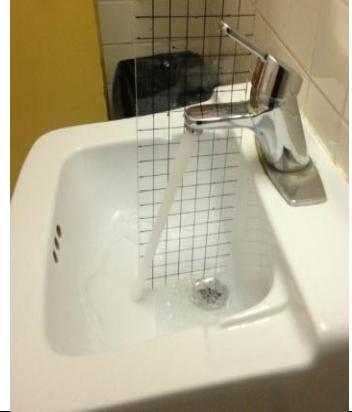
Tableau A2.4 Hôpital 4 - Résultats des analyses microbiologiques (suite)

ID	Type de robinet	Drain colonisé	Eau CFU/100mL	Détection enzymatique (MPN/100mL)
411	RC	0	<1	<1
412	RE	0	<1	<1
413	RC	1	<1	<1
414	RE	1	<1	<1
415	RC	1	<1	<1
416	RC	0	<1	<1
417	RC	0	<1	<1
418	RC	0	<1	<1
419	RC	0	<1	<1
420	RC	0	<1	<1
421	RC	0	<1	<1
422	Pédale	0	<1	<1
423	Pédale	0	<1	<1
424	RE	0	<1	<1
425	RE	0	<1	<1
426	RC	1	<1	<1
427	RE	0	<1	<1
428	RE	1	<1	<1
429	RE	0	<1	<1
430	RE	1	<1	<1

ANNEXE 3 Catalogue des principaux robinets échantillonnés

Robinets électroniques avec contrôle de T°	
Marque Hansa (modèle Mix)	
Marque Hansa (modèle Cobra)	
Marque Geberit	
Marque Sloan	

Robinets électroniques avec contrôle de T° séparé	
Marque Chicago	
Marque Zurn	
Robinets conventionnels	
Marque American Standard (mitigeur)	

	<p>Marque Crane (mélangeur)</p> 
	<p>Marque Delta (mitigeur)</p> 
	<p>Marque Hansa (mitigeur)</p> 
	<p>Marque Powers (mélangeur)</p> 

	<p>Marque Teck (mélangeur)</p> 
	<p>Marque Zurn (mélangeur)</p> 
Robinets à pédales	
	<p>Chicago</p> 

	 A photograph of a white ceramic sink with a chrome faucet. The sink has a single basin and a drain in the center. The background shows a light-colored wall with a small green mark.	
	 A photograph of a stainless steel sink with a chrome faucet. Water is flowing from the faucet into the sink. A wire mesh strainer sits in the sink. In the background, there is a white wall with a paper towel holder and a small sign that reads "CET IMBOTTIGLIA".	