

EVALUATION DU RISQUE DE CONTAMINATION DES RESEAUX D'EAU POTABLE DANS LES ETABLISSEMENTS DE SANTE PAR PSEUDOMONAS AERUGINOSA DANS LA VILLE DE ANNABA ALGERIE

Reçu le 06/02/2008 – Accepté le 15/06/2008

Résumé

L'eau potable en milieu hospitalier peut être une source d'infection grave en cas d'une contamination microbienne et particulièrement pour les patients immunodéprimés. *Pseudomonas aeruginosa* est parmi les bactéries les plus fréquemment isolées de l'eau potable dans les établissements de santé ainsi cette bactérie demande un apport minimal de nutriments pour sa multiplication et sa survie faisant de l'eau un environnement propice pour son développement et sa propagation, la capacité de cette bactérie de produire un biofilm à l'intérieur des canalisations lui confère une résistance aux désinfectants. Notre étude a porté sur la recherche et le dénombrement de *Pseudomonas aeruginosa* par la méthode de filtration sur membrane dans les réseaux de distribution de l'eau potable des établissements de santé au niveau des centres hospitalo-universitaires de la ville de Annaba, comme indicateur d'une contamination par des bactéries responsables d'infections d'origine hydrique dans les services à haut risque.

Mots clés: eau potable, milieu hospitalier, *Pseudomonas aeruginosa*, dénombrement, évaluation du risque de contamination.

Abstract

In a hospital environment, drinking water could be a source of dangerous infection due to microbial contamination particularly for immune-deficient patients. *Pseudomonas aeruginosa* is among the most frequently isolated bacteria from drinking water in health establishments. With a minimum quantity of nutrients for its multiplication and its survival, drinking water becomes a favorable environment for its propagation. These bacteria develop a resistance to disinfectants due to its capacity to produce a biofilm inside of the water canalizations. This study deals with the quest and the counting of *Pseudomonas aeruginosa* using membrane filtration method within the distribution networks of drinking water in CHU health establishments of Annaba city as an indicator of contamination by bacteria that is responsible of infections of hydric origin in high risks services of these hospitals.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, hospital environment, drinking water, contamination, risk evaluation, membrane filtration method, numbering.

N. BOURAFA*
N. BOUTEFNOUCHET

Laboratoire de Microbiologie,
Département de Biochimie,
Université Badji Mokhtar. Faculté des
Sciences BP. 12. 23000 Annaba,
Algérie
*E-mail : boutefnaf@yahoo.fr

ملخص

إن مياه الشرب داخل المحيط الاستشفائي يمكن أن تكون منبعاً لعدوى خطيرة خاصة للمرضى ذوي الجهاز المناعي الضعيف و هذا راجع لتلوثها البكتيري. عادة ما يمكن عزل بكتيريا *Pseudomonas aeruginosa* داخل مياه شرب المؤسسات الاستشفائية و يمكن لهذه البكتيريا أن تتكاثر بشيء قليل من التغذية وبالتالي يصبح ماء الشرب محيطاً مواتياً لانتشارها. هذه البكتيريا تطور مقاومة للمنظفات و هذا راجع لقدرتها على إنتاج غشاء حيوي داخل المجاري المائية. هذه المقالة تتعامل مع بحث و حساب البكتيريا المدروسة باستعمال التصفية بالغشاء داخل شبكة توزيع مياه الشرب لمدينة عنابة كمؤشر لتلوث ناتج عن بكتيريا مسؤولة عن عدوى ذات مصدر مائي في المصالح الاستشفائية ذات مخاطرة عالية.

الكلمات المفتاحية: الاستشفائي, مياه الشرب, التلوث المخاطرة, طريقة التصفية بالغشاء التعداد لدالة *Pseudomonas aeruginosa*,

I- INTRODUCTION

En milieu hospitalier la qualité de l'eau potable est susceptible de se dégrader à tout moment entre l'usine de traitement et les points d'usages au niveau des services hospitaliers, plusieurs causes sont à l'origine de cette dégradation tels que : la concentration en chlore résiduel, le développement de biofilm, la stagnation de l'eau, l'état de l'entretien des canalisations, la température ainsi que la turbidité. Le réseau de distribution de l'eau potable dans les établissements de santé est souvent soumis à une pression de contamination microbiologique qui constitue de véritables niches écologiques. *Pseudomonas aeruginosa* est parmi les bactéries les plus fréquemment isolées, cette bactérie est pathogène opportuniste peu virulente chez les individus normaux et au contraire pathogène spécifique chez les sujets dont les moyens de défenses sont altérés.

La présence de *Pseudomonas aeruginosa* dans l'eau potable en milieu hospitalier n'est pas admissible, notamment en raison de son caractère de pathogène opportuniste, de sa résistance aux désinfectants et aux antibiotiques et de la difficulté à éliminer cette bactérie lorsqu'elle colonise des réseaux de distributions ou d'autres installations. De ce fait l'objectif de notre travail est d'évaluer la contamination du réseau de distribution de l'eau potable en milieu hospitalier par cette bactérie, d'identifier les principaux modes de défaillance des installations de distribution de l'eau potable et les origines des altérations de la qualité de l'eau, de préciser les risques sanitaires associés à la présence de cette bactérie dans les réseaux d'eau potable, d'établir une relation entre la contamination de l'eau potable en milieu hospitalier et la survenue des infections nosocomiales d'origine hydrique et enfin d'élaborer un schéma de surveillance du réseau d'eau potable à l'hôpital.

II- MATERIELS ET METHODES

II-1- Stratégie d'échantillonnage

II-1-1- Choix du site du prélèvement

Les sites de prélèvements d'eau potable dans les établissements de santé ont ciblé les services à haut risque infectieux. Les services choisis sont mentionnés ci-dessous :

- CHU - IBN-Rochd : service d'urologie, de chirurgie générale, de réanimation, de bactériologie, des urgences et la salle d'accouchement.
- CHU - Dorban : service de pneumologie, de dermatologie, de bactériologie et d'infectieux.
- CHU - IBN-Sina : service des brûlés, de néphrologie, de réanimation, des urgences et de cardiologie.

II-1-2- Mode de prélèvement

Les prélèvements ont été effectués après stérilisation du robinet et écoulement de l'eau dans des contenants stériles

de verre de capacité d'environ 250 ml et contenant une solution de thiosulfate de sodium à 1% à ajouter en raison de 1 ml pour 1L d'eau pour les analyses bactériologiques [1, 2].

II-1-3- Transport et conservation des échantillons

Tout flacon d'échantillonnage doit être clairement identifié, un délai maximal admissible pour l'analyse est de 24 heures après le prélèvement, mais l'idéal est de procéder à l'analyse dans l'heure suivante. L'échantillon devrait être protégé contre les effets de la température à l'aide d'un isolant thermique pendant le transport qui se fait dans une glacière portable (aux environs de 4°C).

III- 2- Analyse bactériologique

II-2-1- Recherche et dénombrement de *Pseudomonas aeruginosa* par méthode par filtration sur membrane

Cette méthode consiste à recueillir, identifier et énumérer à la surface d'une membrane filtrante stérile de 0,45 µm de diamètre de pores incubée sur gélose sélective, les colonies de la bactérie à étudier présentes à la surface de la membrane filtrante. Les résultats sont exprimés en UFC /100 ml (unité formant colonie). Pour ce faire il s'agit de filtrer à travers la membrane un volume déterminé de l'échantillon d'eau à analyser en utilisant l'appareil de filtration (Rompe de filtration sartorius 16824 membrane filtre. Mixed cellulose ester 0.45µm) adapté aux analyses bactériologiques des eaux [3, 4].

I-2-2- Analyse de l'échantillon

Le volume filtré est choisi de manière à obtenir moins de 100 colonies sur la surface de la membrane, car au delà les phénomènes de confluence et de compétition limitent la croissance bactérienne. Le volume utilisé est de 100 ml et constitue le volume de référence selon les normes de potabilité. Dans le cas où le nombre de colonies est supérieur à 100, il est nécessaire de faire des dilutions de l'échantillon ou de filtrer un volume plus faible. Après filtration déposer aseptiquement la membrane sur la gélosé au cétrimide sélective pour *Pseudomonas aeruginosa* puis mettre l'ensemble dans un incubateur réglé à 41°C pendant 48 heures [4].

II-2-3- Dénombrement des colonies en UFC/100ml

Etant donné la sélectivité du milieu et de la température, il en résulte une croissance sélective de *Pseudomonas aeruginosa* caractérisée par des colonies vertes fluorescentes. Cependant dans certains cas ces résultats peuvent produire des faux positifs ou des faux négatifs qu'il faut l'éliminer à l'aide des examens microscopiques, de la mise en évidence du test oxydase et d'une identification biochimique en utilisant une galerie

miniaturisé API20NE. L'expression des résultats pour la détermination du nombre de *P. aeruginosa* pour 100ml d'eau a été évaluée selon la formule donnée par la norme NFT 90-421 [5].

A partir de la surface des membranes filtrante procéder à une subculture des colonies caractéristiques à confirmer sur une gélose nutritive coulée en boites de pétri. Incuber à 30 °C pendant 18 à 24 heures ; après incubation voir s'il s'agit de colonies présentant la morphologie et la pigmentation caractéristique de *P.aeruginosa*, procéder ensuite à une coloration de Gram, mise en évidence du test oxydase et identification biochimique en utilisant une galerie miniaturisé API20 NE.

II-2-4- Détermination des sérogroupes : sérotypage

La sérotypie a été effectuée avec 16 sérums monovalents permettant le classement des souches de *Pseudomonas aeruginosa* en sérogroupes O : 1 à O : 16 adopté à la classification établie par HABS et complétée par la sous comité international des pseudomonas [6].

II-3- Analyse physico-chimique:

Les analyses physico-chimiques procédées aux échantillons d'eau potable prélevés en milieu hospitalier ont inclus les paramètres suivants : le PH, la température, le chlore résiduel et la turbidité.

IV- RESULTATS

III-1- Analyse bactériologique :

Les résultats du dénombrement de *Pseudomonas aeruginosa* selon la méthode de la filtration sur membrane a montré la présence de cette bactérie dans tous les échantillons d'eaux potables analysés en quantité variable, d'un établissement à l'autre et au sein d'un même établissement, en fonction des services, des patients (sains, colonisés ou infectés), des soins et des techniques pratiquées. Les figures 1, 2 et 3 représentent le nombre d'UFC / 100 ml en fonction des services des CHU de la ville de Annaba.

La figure 1 illustre le nombre de *Pseudomonas aeruginosa* dans les échantillons d'eau potable analysés au niveau des différents services du CHU Ibn-Rochd. L'échantillon d'eau potable prélevé dans le laboratoire de bactériologie présente le niveau de contamination le plus élevé avec une valeur de 78 UFC/100 ml par contre les échantillons d'eau prélevés dans les services d'urologie de chirurgie et de réanimation présentent un nombre d'UFC/100 ml moins élevé, en revanche la salle d'accouchement et le service des urgences sont classés les moins contaminés.

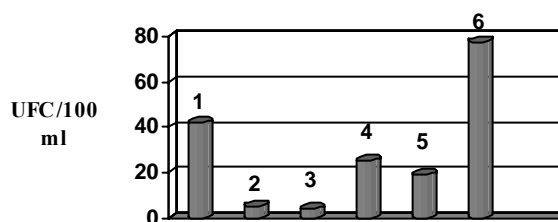


Figure 1 : Nombre d'UFC/100ml en fonction des services du CHU-Ibn-Rochd.

1 : Service de réanimation, 2 : Service des urgences, 3 : Service des accouchements, 4 : Service d'urologie, 5 : Service de chirurgie, 6 : Service de bactériologie.

La figure 2 illustre le nombre de *Pseudomonas aeruginosa* dans les échantillons d'eau potable analysés au niveau des différents services du CHU Ibn-Sina. Le service des brûlés occupe la première place en terme de contamination avec une valeur de 72 UFC/100 ml, suivi par le service de réanimation avec une valeur de 44 UFC/100 ml, les services des urgences de cardiologie et néphrologie présentent une valeur inférieure à 10 UFC/100 ml..

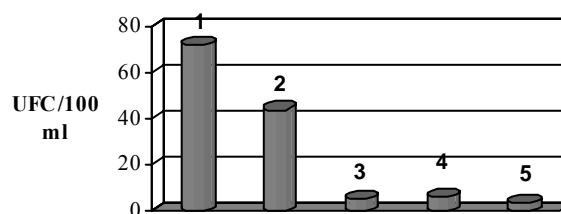


Figure 2: Nombre d'UFC/100ml en fonction des services du CHU-Ibn-Sina.

1 : Service des brûlés, 2 : Service de réanimation, 3 : Service des urgences, 4 : Service de néphrologie, 5 : Service de cardiologie.

La figure 3 illustre le nombre de *Pseudomonas aeruginosa* dans les échantillons d'eau potable analysés au niveau des différents services du CHU-Dorban. C'est au niveau du service de bactériologie que nous avons enregistré un taux de contamination le plus élevé avec une valeur de 66 d'UFC/100 ml, suivi par les services de pneumologie et d'infectieux avec des valeurs respectives de 52 et 44 UFC/100 ml, cependant le service de dermatologie a enregistré une valeur inférieure à 10 UFC/100 ml.

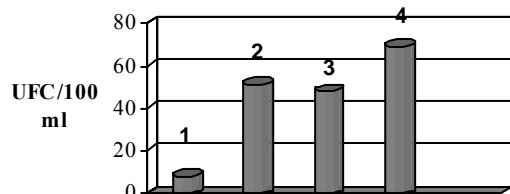


Figure 3 : Nombre d'UFC/100ml en fonction des services du CHU-Dorban.

1 : Service de dermatologie, 2 : Service de pneumologie, 3 : Service d'infectieux, 4 : Service de bactériologie.

Les résultats de sérotypage des souches de *Pseudomonas aeruginosa* collectées ont permis de distinguer 8 groupes antigéniques : O :1, O :2, O :3, O :6, O : 9, O :11, O :12, et O :13 ; les sérogroupes :O :4, O :5, O :7, O :8, O :10, O :14, O :15, et O :16 n'ont pas été mis en évidence. D'autres parts, quelques souches non agglutinables ont été retrouvées. La répartition des sérogroupes isolés en fonction des services hospitaliers ciblés est représentée dans le tableau1.

Tableau 1 : Répartition des sérogroupes de *Pseudomonas aeruginosa* en fonction des services
CHU : Centre Hospitalo Universitaire, NA :

CHU	Service	Nombre des Souches	O ₁	O ₂	O ₃	O ₆	O ₉	O ₁₁	O ₁₂	O ₁₃	NA
Ibn-Rochd	Réanimation	10 souches							10		
	Urgences	5 souches	5								
	Salle d'accouchements	04 souches								4	
	Urologie	7 souches							7		
		3 souches									3
	Chirurgie générale	7 souches							7		
		3 souches									3
Bactériologie	15 souches							15			
Ibn-Sina	Brulés	12 souches									12
	Réanimation	8 souches				8					
	Urgences	6 souches									6
	Néphrologie	6 souches									6
	Cardiologie	4 souches				4					
Dorban	Dermatologie	8 souches					8				
		6 souches						6			
	Pneumologie	7 souches		7							
		12 souches			12						
	Bactériologie	4 souches						4			
		10 souches		10							

Non-Agglutinable

Selon les résultats mentionnés nous remarquons qu'il a une diversification des sérogroupes d'un établissement à l'autre et au sein d'un même établissement en fonction

des services. Cette diversification peut être liée avec l'origine de contamination tels que les patients infectés par des souches de sérogroupes différents aussi la contamination peut survenir lors du lavage des mains de ces patients ou du personnel soignant ainsi cette bactérie peut se développer sur les matériaux inappropriés en contact avec l'eau du robinet.

III-2- Analyses physicochimiques

Les résultats des analyses physicochimiques des échantillons d'eau potable prélevés dans les différents services hospitaliers ciblés sont représentés dans le tableau 2. Nous remarquons une homogénéité pour tous les échantillons d'eau potable analysés concernant les deux paramètres physico-chimiques : la température et le pH; le pH a donné des valeurs équivalentes aux normes de potabilité comprise entre (6,5 et 6,6) et constituent en même temps l'optimum pour la croissance de *P.aeruginosa* et comme nos prélèvements ont été réalisé en période d'hivers (du mois de janvier au mois mars) la température a donné des valeurs presque stables pour tous les échantillons d'eau potable analysés en fait

Pseudomonas aeruginosa est capable d'établir sa niche écologique à un large éventail de température. D'autre part, nous remarquons que dans la majorité des échantillons analysés l'élévation de la turbidité s'accompagne d'une diminution de la concentration en chlore résiduel, ceci se traduit par la présence d'un contenu élevé en matières en suspension et en matières colloïdales d'origine minérale ou organique consommatrice d'oxydant (voir figure 4). Il faut noter que

lorsque la turbidité est égal ou supérieures à 5 UTN les cas d'échec de la désinfection sont fréquents, c'est pourquoi il est universellement admis que pour assurer le

EVALUATION DU RISQUE DE CONTAMINATION DES RESEAUX D'EAU POTABLE DANS LES ETABLISSEMENTS DE SANTE PAR *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* DANS LA VILLE DE ANNABA ALGERIE

succès de la désinfection la turbidité doit toujours être inférieur à 5 UTN et de préférence inférieures à 1 UTN.

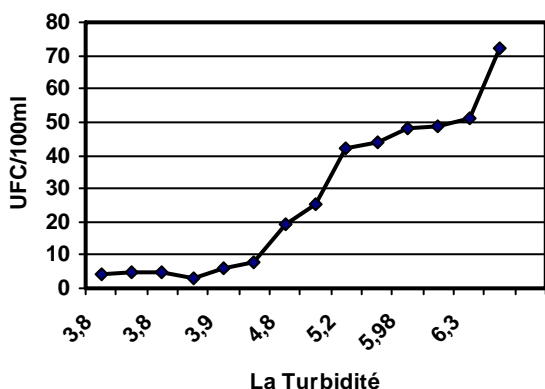
Tableau 2 : Analyse physicochimique de l'eau

CHU	Service	N° de prélèvement	Date de prélèvement	Analyses physico-chimiques			
				Température	PH	Turbidité	Chlore résiduel
Ibn-Rochd	Réanimation	P1	08/01/06	19.00	6.6	5.2	0.09
	Urgence	P2	11/01/06	19.00	6.6	3.8	0.20
	Salle d'accouchement	P3	11/01/06	19.00	6.6	3.8	0.19
	Urologie	P4	15/01/06	19.00	6.6	4.8	0.19
	Chirurgie	P5	15/01/06	19.00	6.6	4.8	0.10
	Bactériologie	P6	31/01/06	19.00	6.6	6.30	0.10
Ibn-sina	Brûlés	P7	05/02/06	19.00	6.6	6.90	0.02
	Réanimation	P8	14/02/06	19.00	6.6	5.40	0.09
	Urgence	P9	28/02/06	20.00	6.6	3.80	0.20
	Néphrologie	P10	28/02/06	20.00	6.6	3.9	0.20
	Cardiologie	P11	28/02/06	20.00	6.6	3.9	0.22
Dorban	Dermatologie	P12	03/03/06	20.00	6.6	4.8	0.17
	Pneumologie	P13	11/03/06	20.00	6.5	6.40	0.02
	Infectieux	P14	11/03/06	20.00	6.5	5.98	0.05
	Bactériologie	P15	11/03/06	20.00	6.6	6.00	0.03

IV- LA CORRELATION DES RESULTATS D'ANALYSE PHYSICOCHIMIQUE ET BACTERIOLOGIQUE DE L'EAU

La corrélation des résultats d'analyse physicochimique et bactériologique de l'eau nous montre qu'il y a une relation proportionnelle entre la turbidité et le nombre d'UFC/100ml ; plus que la turbidité augmente, le nombre d'UFC augmente (graphe 1); en revanche, nous remarquons qu'il y a une relation inversement proportionnelle entre la concentration de chlore résiduel et le nombre d'UFC (graphe 2).

Graphe (1): le Nombre d'UFC/100ml en fonction de la turbidité



Graphe (2): Le nombre d'UFC/100ml en fonction de la concentration en chlore résiduel

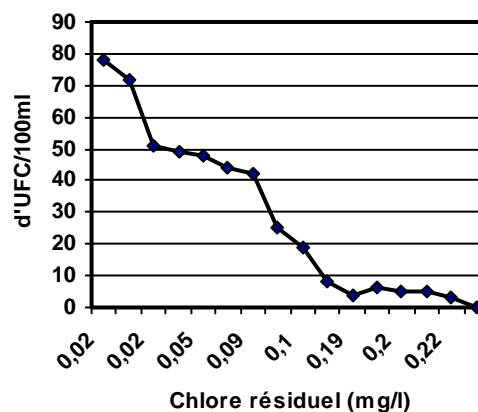


Figure 4 : Concentration du chlore résiduel en fonction de la turbidité

V. DISCUSSIONS

L'analyse bactériologique par la méthode de la filtration sur membrane des échantillons d'eau potable prélevés à partir des services hospitaliers ciblés a révélé la présence de *Pseudomonas aeruginosa* dans tous les échantillons analysés, au total 137 souches de *Pseudomonas aeruginosa* ont été collectées lors de notre étude. La différence quantitative d'UFC/100 ml d'eau peut être expliquée par la répartition non homogène de bactéries à

l'intérieur du réseau de l'eau potable présentes sous forme de biofilm, la quantité échantillonnée dans un prélèvement d'eau peut varier considérablement d'un prélèvement à l'autre en fonction du détachement ou non d'une partie du biofilm au moment du prélèvement. D'autre part, les réseaux peuvent être vétustes et la perte en chlore est rapide, ainsi même sur les réseaux en bon état, il est souvent difficile de maintenir un taux de chlore sur de grandes longueurs de canalisations surtout si ces derniers sont colonisés par des biofilms qui sont également des consommateurs de chlore en puissance.

La contamination du réseau de l'eau potable des établissements de santé par cette bactérie est fortement liée à la colonisation quasi-permanente des siphons d'installations sanitaires qui peut lors d'éclaboussures contaminer l'eau du robinet par voie rétrograde, la contamination de l'eau du robinet peut aussi provenir lors de l'utilisation de l'eau potable via des mains souillées des patients ou du personnel soignant. Le laboratoire de bactériologie constitue le siège où les bactéries sont cultivées, détectées et identifiées, ceci explique le niveau de contamination le plus élevé observé dans les échantillons d'eau potable prélevés au sein de ces derniers. Il est à noter que dans le service des brûlés l'eau livrée est une eau traitée, les échantillons d'eau potable prélevés dans ce service ont présenté une contamination appréciable due principalement au type des patients qui les y hébergent, vu que *Pseudomonas aeruginosa* vit préférentiellement dans l'environnement humide et trouve sur les surfaces des brûlures humides le lieu privilégié pour sa croissance et sa dissémination. Des travaux récents [7] ont mis en évidence que les précautions prises dans les unités des grands brûlés (filtre à air, masque et gant stériles) ne prévenaient pas l'infection puisque *Pseudomonas aeruginosa* était véhiculé par l'eau du robinet, d'autres [8] montrent que la contamination de l'eau du robinet par *Pseudomonas aeruginosa* est rétrograde et les souches peuvent provenir le plus souvent des patients infectés. Dans les autres services à haut risque ciblés lors de cette étude l'origine de la contamination peut être liée à la présence des patients colonisés ou infectés par *P.aeruginosa*. A cet égard *Pseudomonas aeruginosa* est responsable de 11 % des infections urinaires nosocomiales suite à de manœuvres instrumentales et d'interventions chirurgicales, de 20 % des infection pulmonaires et de 16 à 30 % des patients en réanimation peuvent être colonisés par cette bactérie suite à l'inhalation des aérosols contaminés ou en raison de caractère invasif, des actes médicaux qui sont pratiqués et/ou de la fragilité des malades qui sont hospitalisés [9] ; ces chiffres permettent d'expliquer la contamination de l'eau potable prélevée dans les services hospitaliers à haut risque.

CONCLUSION

La surveillance de la qualité de l'eau potable dans les établissements de santé repose sur une démarche globale de gestion des risques sanitaires d'origine hydrique, intégrant notamment la mise en place des mesures

préventives et correctives permettant de maîtriser les risques afin d'assurer un niveau de sécurité sanitaire satisfaisant. Les risques microbiologiques liés aux différents usages de l'eau à l'hôpital doivent être évalués en fonction du type de patients traités dans chacune des unités et conduire à des mesures de prévention adaptées et cohérentes avec le degré de risque du patient, ainsi une expertise technique du réseau en vue de corriger les anomalies, l'entretien régulier de la robinetterie (détartrage et désinfection) et des installations techniques assure une maîtrise satisfaisante de la potabilité de l'eau, des traitements complémentaires de l'eau fournissent une eau exempte de micro-organismes pathogènes dans les zones aux quelles sont admis des patients à haut risque infectieux.

REFERENCES

1. [Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec, Recherche et dénombrement de *Pseudomonas aeruginosa* : méthode par filtration sur membrane. MA .700 - PSE 1.0, Rév. 2, Ministère du développement durable, de l'environnement et des parcs du Québec, Vol. 18 (2005), p. 8.
2. Guignement S., Perraud M., "Réalisation de prélèvement et interprétation de résultats" *Hygiène*, Vol. VII, N°3 (2000), pp. 147-148.
3. Ettel W., Baumgartner A., *Manuel suisse des denrées alimentaires*, Chapitre 56, MSDA, Vol. 5, (2000), pp. 1-3.
4. Sazakmi E, Leotsinidis M., "Comparative typing of *Pseudomonas* species isolated from the aquatic environment in Greece by" SDS-PAGE and RAPD analysis, Vol. 13, pp. 1191-1203, (2005).
5. Westwood D., "The Microbiology of Drinking Water - Part 8 - Methods for the isolation and enumeration of *Aeromonas* and *Pseudomonas aeruginosa* by membrane filtration Methods for the Examination of Waters and Associated", Vol. 19, (2002) p 1-47.
6. Geraldine Pina, Pelphine Raynaud, DES Bactériologie-Virologie "critères de choix d'une méthode d'identification" (2003), pp. 1-28.
7. Pierre C., "Groupe scientifique sur l'eau 2003, Personnes vulnérables aux infections microbiennes", *Dans fiche synthèse sur l'eau potable et la santé humaine*, Institut National de Santé Publique du Québec, Vol. 11, p. 5.
8. Talon D., Thouverez M., Bertrand X. "Rôle des *pseudomonas* et apparentés dans les infections nosocomiales", *Service d'Hygiène Hospitalière, CHU Jean Minjoz, Besançon*, Vol. 3. (2006), pp. 1-2.
9. Vallés J, Mariscal D, Cortés P, Coll P, Villagrà A, Díaz E, Artigas A., Rello, "J. Patterns of colonization by *Pseudomonas aeruginosa* in intubated patients: a 3-years prospective study of 1607 isolates using pulsed-field gel electrophoresis with implications for prevention of ventilator-associated pneumonia", *Intensive Care Med.* Vol. 30, (2004), pp. 1768-1775.