



anses

Méthodes alternatives de mesure des paramètres microbiologiques

Journée Régionale eau potable et santé, 12 novembre 2024, Centre des Congrès de Nancy

BENOÎT GASSILLOUD, THIERRY CHESNOT - LABORATOIRE D'HYDROLOGIE DE NANCY, UNITÉ DE MICROBIOLOGIE

CONNAÎTRE, ÉVALUER, PROTÉGER

1. METHODES ALTERNATIVES, un cadre réglementaire défini



Méthodes ALTERNATIVES : un cadre réglementaire défini.



Dans le domaine de la microbiologie des eaux la recherche des **paramètres microbiologiques** dans le cadre du **CONTRÔLE SANITAIRE** de la qualité des eaux s'effectue à l'aide de **METHODES VALIDEES ET NORMALISEES** (méthodes de référence).

Directive européenne

23.12.2020 FR Journal officiel de l'Union européenne L 435/1

DIRECTIVE (UE) 2020/2184 DU PARLEMENT EUROPÉEN ET DU CONSEIL

du 16 décembre 2020

relative à la qualité des eaux destinées à la consommation humaine

(refonte)

(Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE)

LE PARLEMENT EUROPÉEN ET LE CONSEIL DE L'UNION EUROPÉENNE,

Paramètres concernés ? (1/3)

ANNEXE I

EXIGENCES MINIMALES RELATIVES AUX VALEURS PARAMÉTRIQUES UTILISÉES POUR ÉVALUER LA QUALITÉ DES EAUX DESTINÉES À LA CONSOMMATION HUMAINE

Partie A

Paramètres microbiologiques

| Paramètres | Valeur paramétrique | Unité | Notes |
|--|---------------------|---------------|--|
| Entérocoques intestinaux | 0 | nombre/100 ml | Pour les eaux mises en bouteilles ou en récipients, l'unité est le nombre/250 ml |
| <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>) | 0 | nombre/100 ml | Pour les eaux mises en bouteilles ou en récipients, l'unité est le nombre/250 ml |

Entérocoques intestinaux et *E. coli* :

Indicateurs bactériens révélateurs de contaminations d'origine fécale.

Méthodes ALTERNATIVES : un cadre réglementaire défini.



Dans le domaine de la microbiologie des eaux la recherche des **paramètres microbiologiques** dans le cadre du CONTRÔLE SANITAIRE de la qualité des eaux s'effectue à l'aide de METHODES VALIDEES ET NORMALISEES (méthodes de référence).

Paramètres concernés ? (2/3)

Directive européenne

23.12.2020 FR Journal officiel de l'Union européenne L 435/1

DIRECTIVE (UE) 2020/2184 DU PARLEMENT EUROPÉEN ET DU CONSEIL

du 16 décembre 2020

relative à la qualité des eaux destinées à la consommation humaine

(refonte)

(Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE)

LE PARLEMENT EUROPÉEN ET LE CONSEIL DE L'UNION EUROPÉENNE,

Bactéries coliformes, spores de bactéries anaérobies sulfitoréductrices :
des indicateurs d'efficacité de traitement

Partie C

Paramètres indicateurs

| Paramètres | Valeur paramétrique | Unité | Notes |
|---|--------------------------|---------------|---|
| Aluminium | 200 | µg/l | |
| Ammonium | 0,50 | mg/l | |
| Chlorures | 250 | mg/l | Les eaux ne devraient pas être corrosives. |
| Clostridium perfringens (y compris les spores) | 0 | nombre/100 ml | Ce paramètre est mesuré si l'évaluation des risques indique qu'il convient de le faire. |
| Teneur en colonies à 22 °C | Aucun changement anormal | | |
| Bactéries coliformes | 0 | nombre/100 ml | Pour les eaux mises en bouteilles ou en récipients, l'unité est le nombre total/250 ml. |

Méthodes ALTERNATIVES : un cadre réglementaire défini.



Dans le domaine de la microbiologie des eaux la recherche des **paramètres microbiologiques** dans le cadre du CONTRÔLE SANITAIRE de la qualité des eaux s'effectue à l'aide de METHODES VALIDEES ET NORMALISEES (méthodes de référence).

Paramètres concernés ? (3/3)

Directive européenne

23.12.2020 FR Journal officiel de l'Union européenne L 435/1

DIRECTIVE (UE) 2020/2184 DU PARLEMENT EUROPÉEN ET DU CONSEIL

du 16 décembre 2020

relative à la qualité des eaux destinées à la consommation humaine

(refonte)

(Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE)

LE PARLEMENT EUROPÉEN ET LE CONSEIL DE L'UNION EUROPÉENNE,

Le programme de surveillance opérationnelle prévoit également la surveillance des paramètres suivants dans les eaux brutes afin de vérifier l'efficacité des procédés de traitement contre les risques microbiologiques:

| Paramètre opérationnel | Valeur de référence | Unité | Notes |
|------------------------|---------------------------|--|--|
| Coliphages somatiques | 50 (pour les eaux brutes) | Unités formant des plages (UFP)/100 ml | Ce paramètre est mesuré si l'évaluation des risques indique qu'il convient de le faire. S'il est constaté dans des eaux brutes à des concentrations supérieures à 50 UFP/100 ml, il devrait être analysé après certaines étapes du traitement afin de déterminer le taux (en log) d'abattement par les barrières en place et d'évaluer si le risque de survie de virus pathogènes est suffisamment maîtrisé. |

Coliphages somatiques :

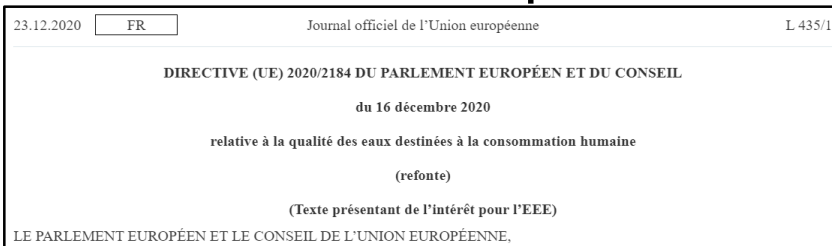
Indicateur VIRAL d'efficacité de traitement

Méthodes ALTERNATIVES : un cadre réglementaire défini.



Dans le domaine de la microbiologie des eaux la recherche des **paramètres microbiologiques** dans le cadre du CONTRÔLE SANITAIRE de la qualité des eaux s'effectue à l'aide de **METHODES VALIDEES ET NORMALISEES** (méthodes de référence).

Directive européenne



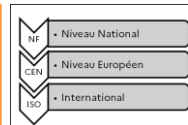
**METHODE
NORMALISEE**

=
FIABILITE
des
résultats

**METHODE
HARMONISEE**

=
COMPARABILITE
des
résultats

METHODE DE REFERENCE
Imposées et normalisées (EN ISO)



Partie A

Paramètres microbiologiques pour lesquels des méthodes d'analyse sont spécifiées

Les méthodes d'analyse utilisées pour les paramètres microbiologiques sont les suivantes:

- Escherichia coli* (*E. coli*) et bactéries coliformes (EN ISO 9308-1 ou EN ISO 9308-2);
- entérocoques intestinaux (EN ISO 7899-2);
- comptage des colonies ou numération des bactéries hétérotrophes à 22 °C (EN ISO 6222);
- Clostridium perfringens*, y compris les spores (EN ISO 14189);
- Legionella* (EN ISO 11731 pour le respect de la valeur indiquée à l'annexe I, partie D);

pour la surveillance de la vérification fondée sur les risques et pour compléter les méthodes par culture, il est en outre possible de recourir à des méthodes telles que ISO/TS 12869, des méthodes par culture rapide, des méthodes non fondées sur la culture et des méthodes moléculaires, en particulier la Q-PCR;

- coliphages somatiques;

Pour la surveillance opérationnelle, on peut recourir à l'annexe II, partie A, EN ISO 10705-2, et EN ISO 10705-3.

Exemple

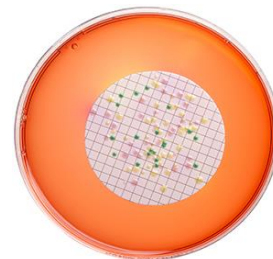
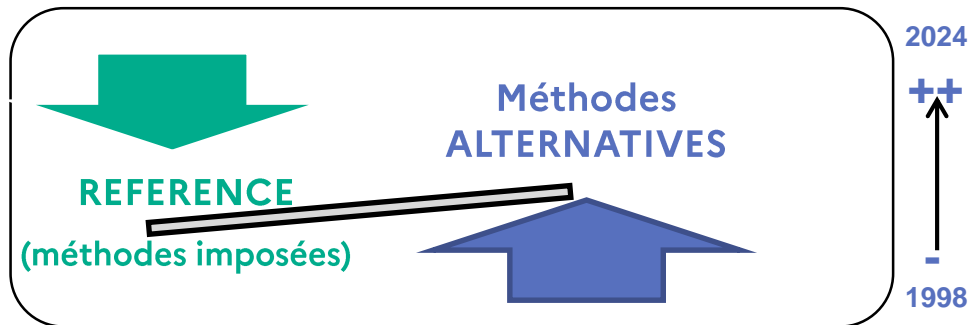
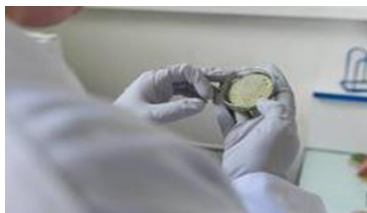


Méthodes ALTERNATIVES : un cadre réglementaire défini.



L'évolution des connaissances dans le domaine de la recherche a conduit à proposer de nouveaux principes analytiques plus SIMPLES et/ou plus RAPIDES.

NOTION DE METHODES ALTERNATIVES



AFNOR 16-09/2016 à 14-41 Pour : ANSES NF EN ISO 16140-1:2016-09

ISSN 0335-3931

norme française NF EN ISO 16140-1 17 Septembre 2016

Indice de classement : V 08-103-1

ICS : 07.100.30

Microbiologie de la chaîne alimentaire — Validation des méthodes — Partie 1 : Vocabulaire

E : Microbiology of the food chain — Method validation — Part 1: Vocabulary
D : Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Verfahrenvalidierung — Teil 1: Terminologie

2.4 méthode alternative
méthode qui est soumise à validation
méthode d'analyse permettant de détecter ou de quantifier, pour une catégorie de produits donnée, le même analyte (2.6) que celui détecté ou quantifié avec la méthode de référence (2.59) correspondante

Note 1 à l'article: La méthode peut être commerciale. L'adjectif « alternatif » se réfère à la totalité du « mode opératoire d'analyse et du système réactionnel ». Ce terme recouvre tous les éléments nécessaires à la mise en œuvre de la méthode, qu'ils soient matériels ou autres.

Méthodes ALTERNATIVES : vérifier l'équivalence avec la méthode de référence ?



ANNEXE III

SPÉCIFICATIONS POUR L'ANALYSE DES PARAMÈTRES

Les États membres veillent à ce que les méthodes d'analyse utilisées à des fins de surveillance et de démonstration de la conformité à la présente directive, à l'exception de la turbidité, soient validées et étayées conformément à la norme EN ISO/IEC 17025 ou à toute autre norme équivalente reconnue à l'échelle internationale. Les États membres veillent à ce que les laboratoires ou les parties engagées par les laboratoires appliquent des systèmes de gestion de la qualité conformes à la norme EN ISO/IEC 17025 ou à toute autre norme équivalente reconnue à l'échelle internationale.

Afin d'évaluer l'équivalence entre les autres méthodes et celles prévues dans la présente annexe, les États membres peuvent utiliser la norme EN ISO 17994, déjà établie en tant que norme pour évaluer l'équivalence des méthodes microbiologiques, la norme EN ISO 16140 ou tout autre protocole analogue reconnu à l'échelle internationale, afin d'établir l'équivalence des méthodes fondées sur des principes autres que la mise en culture, qui sortent du champ d'application de la norme EN ISO 17994.

En l'absence d'une méthode d'analyse qui remplisse les critères minimaux de performance établis dans la partie B, les États membres veillent à ce que la surveillance soit réalisée à l'aide des meilleures techniques disponibles n'entraînant pas de coûts excessifs.

Une **METHODE ALTERNATIVE** doit être en mesure de fournir des **résultats analytiques EQUIVALENTS** à ceux fournis par une méthode de référence, indépendamment du principe méthodologique utilisé (ce dernier point peut poser des problèmes dans certaines situations).

2 normes pour statuer sur L'EQUIVALENCE



Prioritaire



A défaut de pouvoir utiliser l'ISO 17994



EVALUER L'EQUIVALENCE :
une ouverture méthodologique encadrée.

Méthodes ALTERNATIVES : vérifier l'équivalence avec la méthode de référence ?

Un processus complexe
et encadré

ISSN 0335-3931

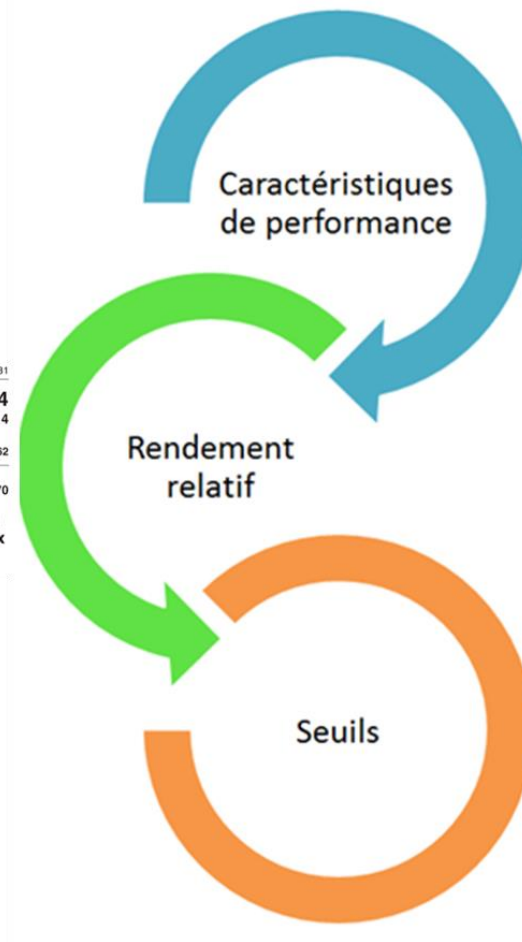
norme française

NF EN ISO 17994
12 Avril 2014

Indice de classement : T 90-462

ICS : 07.100.20 ; 13.060.70

Qualité de l'eau — Exigences pour la comparaison du rendement relatif des microorganismes par deux méthodes quantitatives



norme française

ISSN 0335-3931

NF EN ISO 13843
12 Juillet 2017

Indice de classement : T 90-460

ICS : 07.100.20

Qualité de l'eau —
Exigences pour l'établissement
des caractéristiques de performance
des méthodes microbiologiques quantitatives

**Evaluation bilatérale des
données de comparaison**

EDCH

+/-10%



BAIGNADE

+/-20%



Méthodes ALTERNATIVES : vérifier l'équivalence avec la méthode de référence ?

norme française

ISSN 0335-9931
NF EN ISO 13843
12 Juillet 2017
Indice de classement : T 90-460

ICS : 07.100.20

Qualité de l'eau —
Exigences pour l'établissement
des caractéristiques de performance
des méthodes microbiologiques quantitatives

Organismes
certification

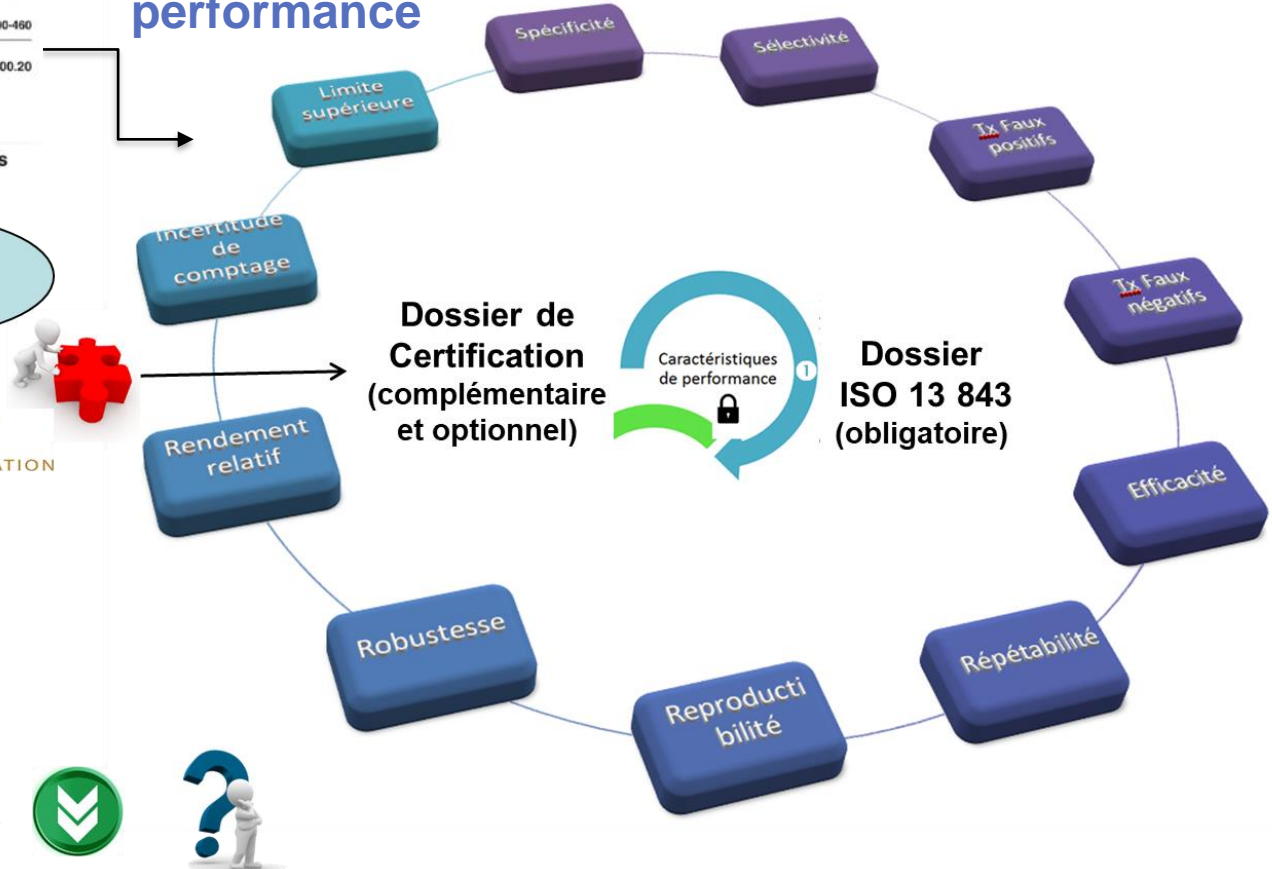
afnor
CERTIFICATION



Etape
préliminaire



Etape 1 : caractéristiques de performance



Méthodes ALTERNATIVES : vérifier l'équivalence avec la méthode de référence ?

norme française

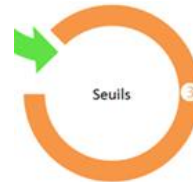
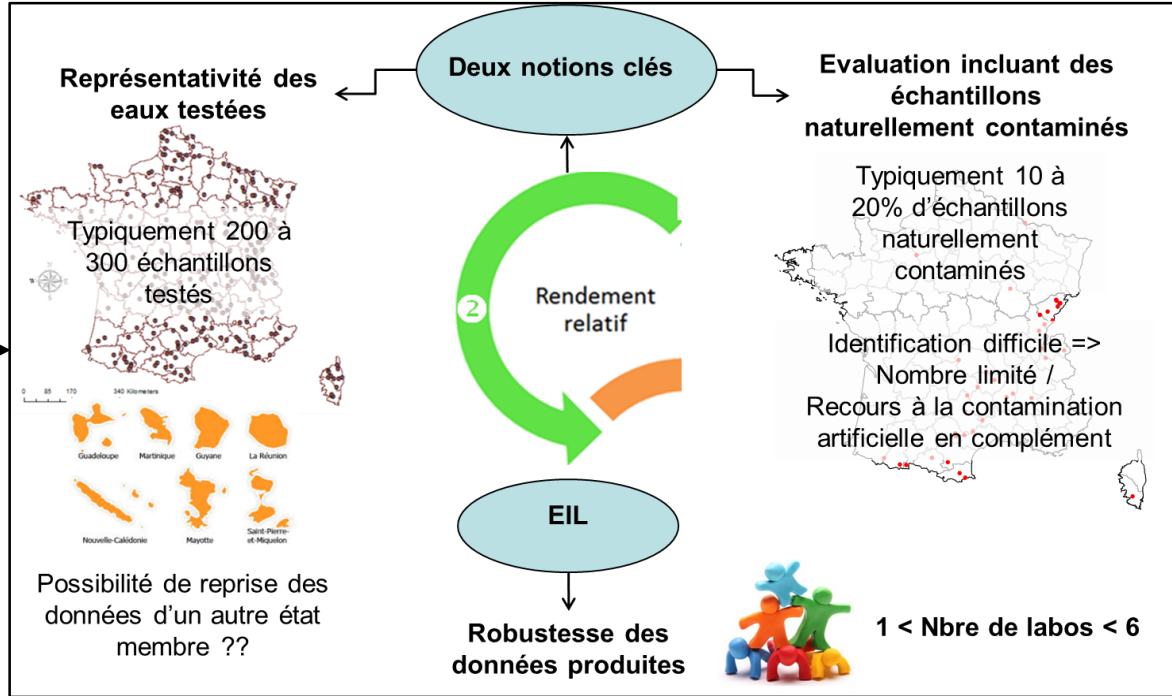
ISSN 0335-3031
NF EN ISO 17994
12 Avril 2014

Indice de classement : T 90-462

ICS : 07.100.20 ; 13.060.70

Qualité de l'eau — Exigences pour la comparaison du rendement relatif des microorganismes par deux méthodes quantitatives

Etape 2 : Rendement relatif (par rapport à la méthode de référence)



Evaluation bilatérale des données de comparaison

| EDCH | BAIGNADE |
|--|--|
| +/-10% | +/-20% |
|  |  |

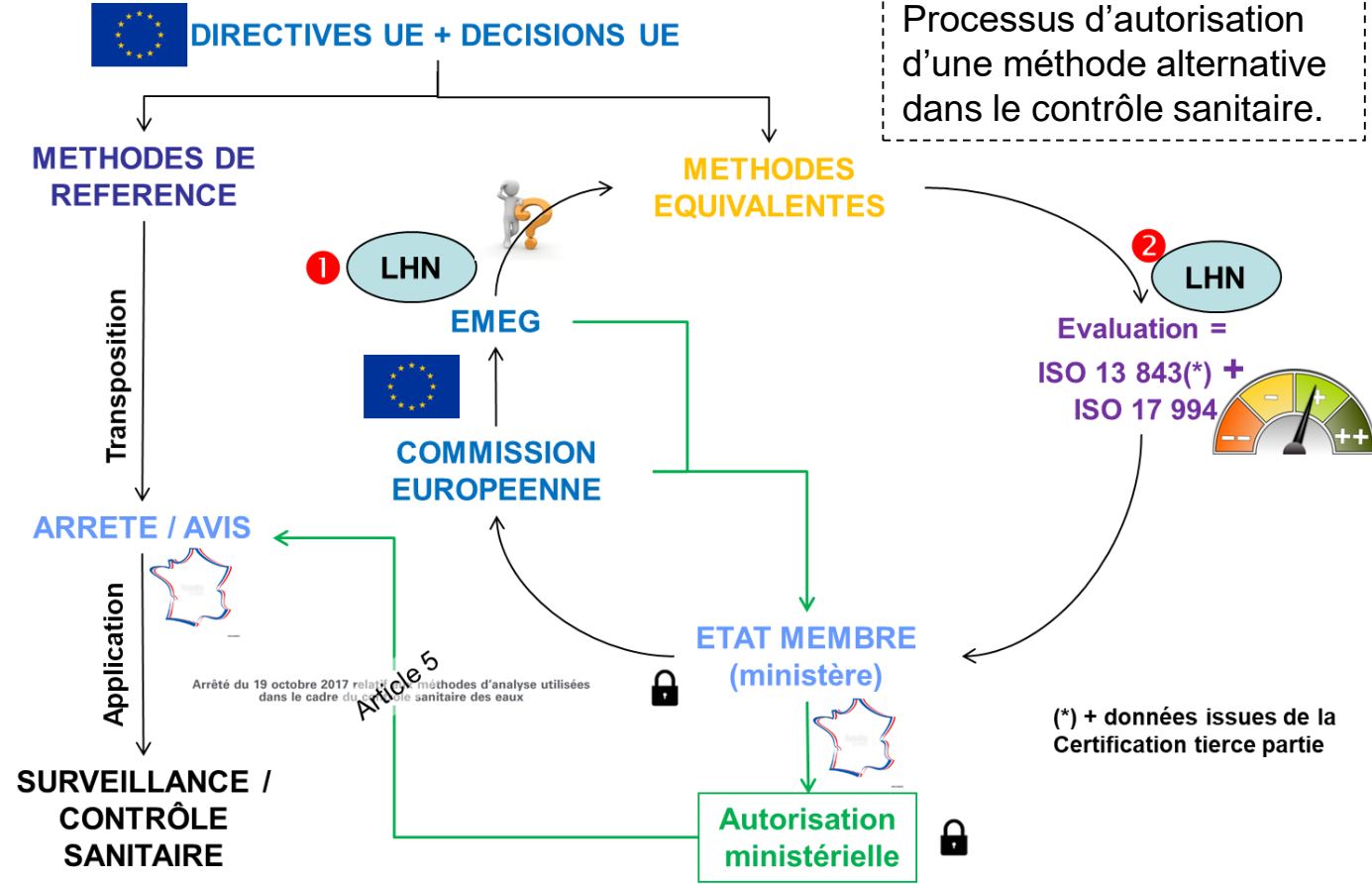
Equivalence



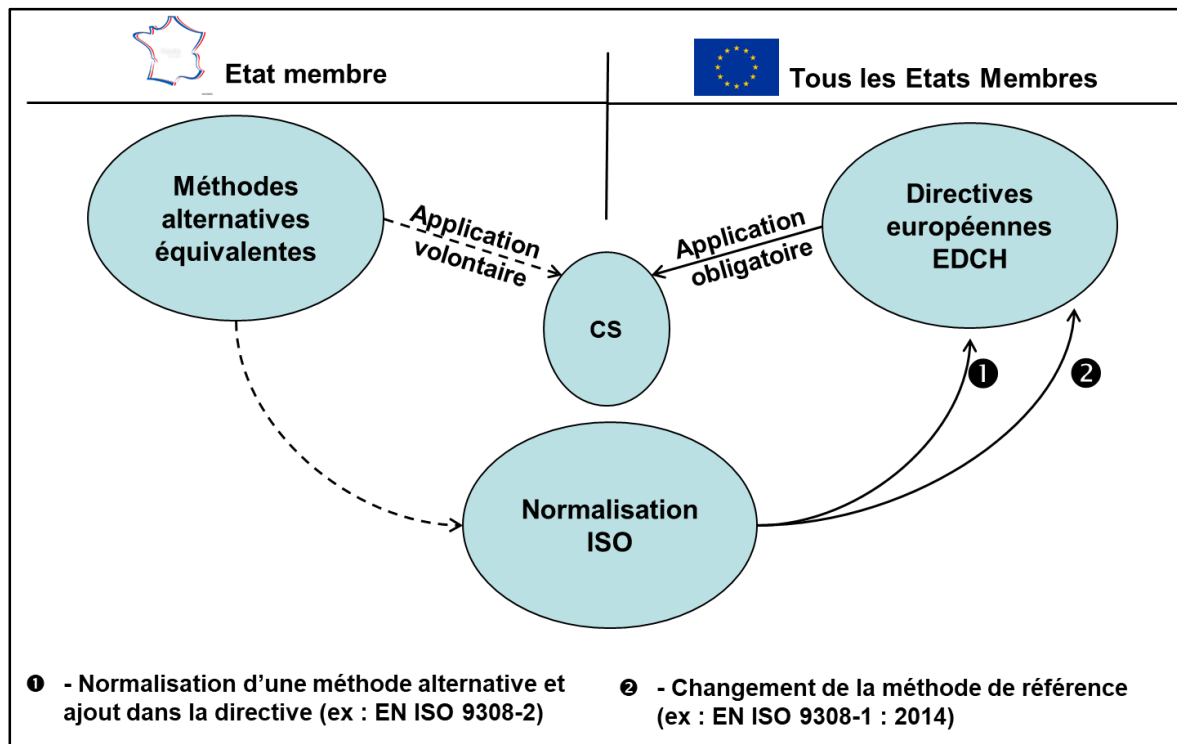
Méthodes ALTERNATIVES : De l'équivalence à l'autorisation ...

Processus d'autorisation d'une méthode alternative dans le contrôle sanitaire.

Pas de méthodes alternatives actuellement utilisées dans le contrôle sanitaire en France



L'établissement de dossier d'équivalence associé aux travaux de normalisation ISO favorisent l'actualisation des directives.



- ① / 1^{er} exemple : Ajout d'une méthode analytique de référence dans la directive
=> NF EN ISO 9308-2
- ② / 2^{ème} exemple : Changement de principe analytique de la méthode de référence
=> NF EN ISO 9308-1 : 2014

2. METHODES RAPIDES



Méthode **ALTERNATIVE**

≠ Méthode **RAPIDE**

- **MISE EN ŒUVRE FACILITEE** pour les phases
 - de conservation des milieux et réactifs,
 - d'ensemencement et de dénombrement

- **RAPIDITE D'INTERPRETATION** grâce à

- un principe analytique simple,
- l'absence (ou la simplification) des étapes de confirmation.

- « **METHODE FOURNISSEUR** » (majoritairement)

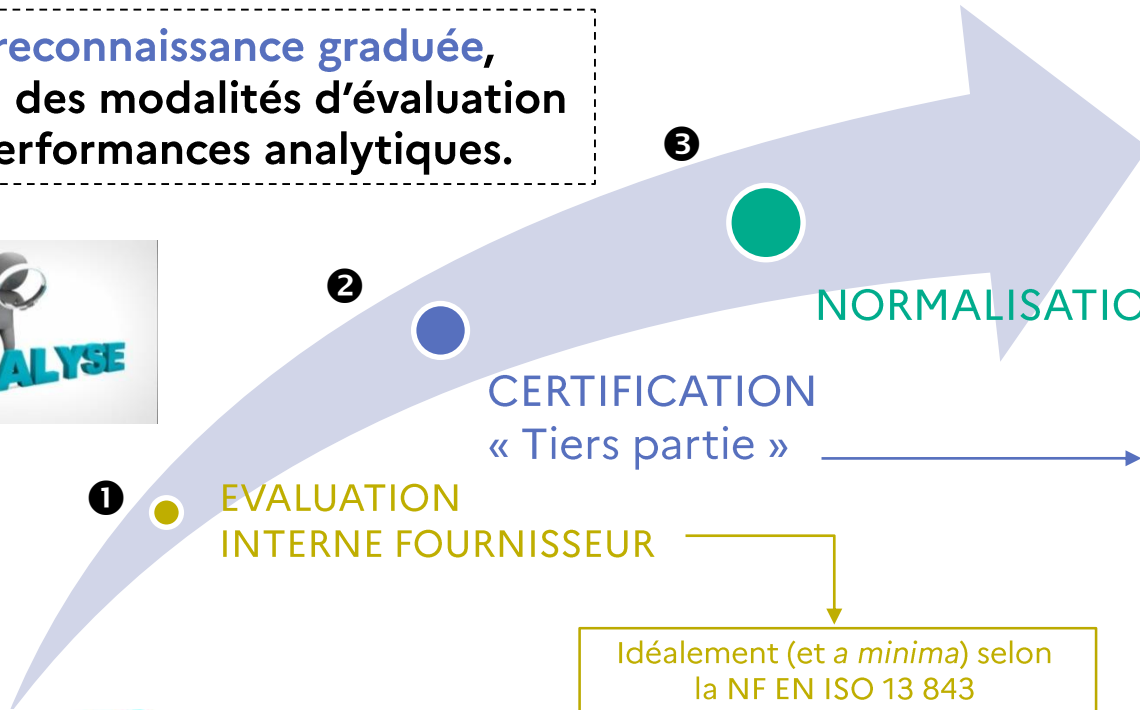
- **EXIGENCE DE CARACTERISATION** moins encadrée.

INTERETS pour une meilleure évaluation de la qualité microbiologique des eaux en permettant par exemple :

- le **déploiement d'une surveillance élargie** en dehors des laboratoires experts,
- un **accroissement de la fréquence des analyses**,
- des **analyses rapides de levée de doute** ou d'orientation dans le cadre de la surveillance réalisée par l'exploitant.

Méthodes « RAPIDES » - Quelle reconnaissance ?

Une reconnaissance graduée,
fonction des modalités d'évaluation
des performances analytiques.



Selon les règles de
normalisation en vigueur

Selon les référentiels des
organismes certificateurs

Idéalement (et *a minima*) selon
la NF EN ISO 13 843

norme française

ISSN 0335-3931
NF EN ISO 13843
12 Juillet 2017
Indice de classement : T 90-460
ICS : 07.100.20

Qualité de l'eau —
Exigences pour l'établissement
des caractéristiques de performance
des méthodes microbiologiques quantitatives



Méthode « RAPIDE »

Nécessitant une étape de mise en culture

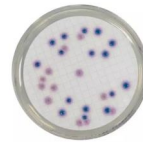
Indépendante de toute étape de mise en culture

Milieus

CHROMOGENIQUES

EVALUATION INDIRECTE
du nombre de micro-organismes cibles

Milieus liquides



Milieus gélosés

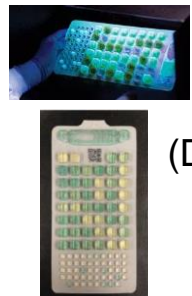
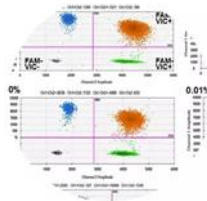
(Dénombrement en NPP/ unité de volume)

(Dénombrement en UFC/unité de volume)

ATP-métrie

PCR

...



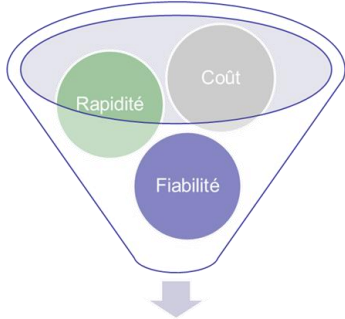
Des méthodes « RAPIDES » aux principes variés, quelques exemples :



Des méthodes disponibles pour de nombreux micro-organismes utiles en gestion et pour des matrices hydriques de nature variée.



Avantage
coût/bénéfices




INTERET



| | | | | | | |
|---------------|--------------------------------|--------------------------|--------------------------------|-----------------------|---------------------|-----|
| Non exhaustif | Bactéries coliformes / E. coli | Entérocoques intestinaux | Pseudomonas aeruginosa | Coliphages somatiques | Legionella | ... |
| Méthodes UFC | Méthodes certifiées et normées | Méthode fournisseur | Méthodes certifiées | Méthode fournisseur | | |
| Méthodes NPP | Méthodes certifiées et normées | Méthodes certifiées | Méthodes certifiées et normées | Méthode fournisseur | Méthodes certifiées | |
| Méthodes PCR | | | | | Méthodes certifiées | |
| ... | | Méthodes certifiées | | | | |

Méthodes « rapides » : des éléments à prendre en compte, en fonction des objectifs recherchés et des enjeux associés :

 - Quel est le **niveau de reconnaissance** de la méthode utilisée, pour la matrice hydrique à analyser (ressource superficielle, eau de réseau, ...)?

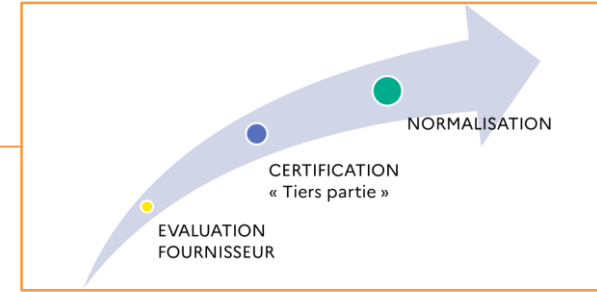


 - Dans une première étape, évaluer la méthode à partir du retour d'expériences en lien avec la **comparaison des résultats obtenus avec les méthodes de référence** (et/ou les méthodes alternatives jugées équivalentes).

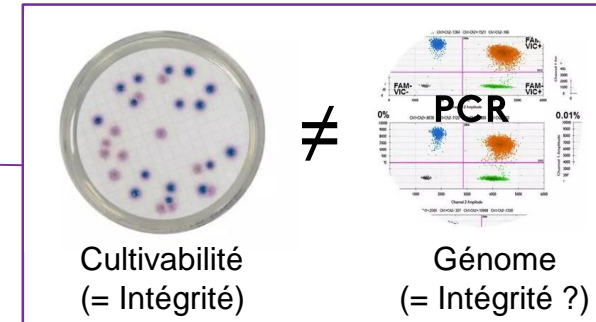


 - Maitriser **l'interprétation des résultats** obtenus avec les méthodes rapides, par exemple la nécessité de considérer :

- les besoins de fréquence et d'historique : (ex : suivi d'ATP-métrie sous format **carte de contrôle**),
- les **différences d'informations fournies** entre les méthodes basées sur les méthodes culturales et les méthodes indirectes, notamment vis-à-vis du potentiel infectieux des agents mesurés.



METHODS DE REFERENCE
validées
(normalisées EN ISO)



A comparison between two methods of detection. On the left is a petri dish with blue and purple colonies, labeled 'Cultivabilité (= Intégrité)'. In the center is a large '≠' symbol. On the right is a PCR gel electrophoresis image with multiple lanes and bands, labeled 'Génome (= Intégrité ?)'. The PCR image includes a scale from 0% to 0.01%.

3. Conclusions



- Une méthode alternative est associée à une méthode de référence,
- Une méthode alternative doit fournir des résultats équivalents à la méthode de référence,
- L'évaluation de l'équivalence est un processus complexe est encadré,
- Aucune méthode alternative n'est actuellement utilisée dans le contrôle sanitaire, mais des évaluations réalisées dans ce cadre ont été favorables à la normalisation de nouvelles méthodes plus simples et plus rapides.
- Il est important de ne pas confondre « méthodes alternatives » et méthodes dites « rapides ».
- Il existe un offre significative de méthodes « rapides » pour lesquelles un cadre d'évaluation graduée des performances techniques existe. Ce dernier point est important à prendre en considération en amont de la sélection des méthodes à utiliser.
- Complémentarité des méthodes de référence du contrôle sanitaire avec les méthodes rapides potentiellement utilisées en surveillance.



MERCI!