
**Demande d'appui scientifique et technique – Equivalence
du projet de norme ISO 9308-1 (version 2014), pour la
recherche et le dénombrement des *Escherichia coli* et des
coliformes dans les eaux destinées à la consommation
humaine, par rapport à la méthode de référence
NF EN ISO 9308-1 (version de 2000)**

Demande : Programme de travail des laboratoires, 2014-2017

Saisine 2019-SA-0032

**RAPPORT
d'appui scientifique et technique**

ETUDE

Septembre 2018

Mots clés

Equivalence, eaux d'alimentation, *Escherichia coli*, bactéries coliformes, milieu chromogénique.
Equivalence, drinking water, *Escherichia coli*, Coliforms bacteria, chromogenic media.

Préambule

Les valeurs réglementaires ou les valeurs guides citées dans ce rapport correspondent à un état de l'art de la bibliographie scientifique et réglementaire identifiée à la date de parution de ce rapport. Elles sont utilisées à titre d'élément de positionnement des résultats et la mise en regard des résultats et des valeurs ainsi identifiées ne constitue pas une évaluation de risque sanitaire de l'agence.

Présentation des intervenants

PARTICIPATION ANSES

Coordination scientifique

M. Benoit GASSILLOUD – Chef d'Unité Microbiologie des Eaux – Anses – Laboratoire d'Hydrologie de Nancy

Contribution scientifique

M. Thierry CHESNOT – Adjoint au Chef d'Unité Microbiologie des Eaux – Anses – Laboratoire d'Hydrologie de Nancy

M. Jean Sébastien PY – Ingénieur et référent statistique au laboratoire – Anses – Laboratoire d'Hydrologie de Nancy

Contribution technique

Mme. Emmanuelle RION – Ingénieur Microbiologie des Eaux – Anses – Laboratoire d'Hydrologie de Nancy

Mme. Amandine WILHELM – Référent technique spectrométrie de masse, plateforme MALDI-TOF – Anses – Laboratoire d'Hydrologie de Nancy

Secrétariat administratif

Mme Sophie MARCHAL-MAUER – Documentaliste – Anses – Laboratoire d'Hydrologie de Nancy

AUDITION DE PERSONNALITÉS EXTÉRIEURES

/

CONTRIBUTIONS EXTÉRIEURES À L'AGENCE

AGLAE 427, rue des Bourreliers, 59 320 Hallennes Lez Haubourdin

SOMMAIRE

Présentation des intervenants	3
Sigles et abréviations	5
Liste des figures	6
1 Rappel de la saisine, contextes réglementaire et normatif.....	7
2 Méthode d'expertise en réponse à la question posée.....	9
3 Modalités d'organisation de l'étude d'équivalence	10
3.1 Pilotage et laboratoires participants.....	10
3.2 Déroulement de l'étude pour les laboratoires participants.....	10
3.3 Sélection des échantillons à analyser	11
3.4 Description des méthodes et tests d'identification opérés.....	12
3.4.1 Méthodes de détection comparées.....	12
3.4.2 Document support d'aide à la sélection des bactéries coliformes et <i>E. coli</i> sur le milieu gélosé CCA (Norme ISO 9308-1 - 2014 et amendement A1 – 2016)	13
3.4.4. Tests complémentaires de confirmation des bactéries	22
4 Analyse statistique.....	23
5 Synthèse des résultats et observations constatées au cours de l'étude ..	25
6 Conclusion	35
7 Bibliographie.....	36
7.1 Publications et communications.....	36
7.2 Normes.....	36
7.3 Législation et réglementation.....	36
ANNEXES	37
Annexe 1 : Groupe EMEG (European Microbiology Expert Group).....	38
Annexe 2 : lettre de saisine n°140003.....	39
Notes.....	41

Sigles et abréviations

AGLAE :	Association générale des laboratoires d'analyses et d'essais
ANSES :	Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
ATCC :	American type culture collection
COFRAC :	Comité français d'accréditation
CCA :	Chromogenic coliform agar
DG. Env.	Direction générale de l'environnement
DGS :	Direction générale de la santé
EDCH :	Eaux destinées à la consommation humaine
EMEG :	European microbiology expert group
ISO :	International organization for standardization
LHN :	Laboratoire d'hydrologie de Nancy
MALDI-TOF :	Matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight
ONPG :	Orthonitrophényl- β -galactoside
STEP :	Station de traitement des eaux usées
SISE-EAUX :	Système d'information des services santé-environnement – Eaux
TTC :	Chlorure de 2,3,5-triphényltétrazolium
UFC :	Unité formant colonie
WDCM :	World data centre for microorganisms

Liste des figures

Figure 1: Cartographie des sites représentatifs	11
Figure 2 : Coloration de différentes souches de <i>E. coli</i> de référence et de souches de <i>E. coli</i> sauvages isolées de l'environnement sur la gélose CCA	14
Figure 3 : Exemple de coloration d'une souche de <i>E. coli</i> issue d'une collection de référence présentant un aspect bleu foncé et « bleu – violet » à classer dans la catégorie 1	15
Figure 4: Exemple de coloration d'une souche de <i>E. coli</i> isolée de l'environnement présentant un aspect bleu à classer dans la catégorie 1	15
Figure 5: Exemple de coloration d'une souche de <i>E. coli</i> isolée de l'environnement présentant un aspect bleu à violet à classer dans la catégorie 1	16
Figure 6: Exemple de coloration d'une souche de <i>E. coli</i> isolée de l'environnement présentant un aspect bleu à classer dans la catégorie 1	16
Figure 7: Exemple de coloration d'une souche de <i>E. coli</i> isolée de l'environnement présentant un aspect bleu – violet à classer dans la catégorie 1	17
Figure 8 : Exemple de coloration d'une souche de <i>E. coli</i> de référence présentant un aspect violet à classer dans la catégorie 2.....	18
Figure 9: Exemple de coloration d'une souche de <i>E. coli</i> isolée de l'environnement présentant un aspect violet à classer dans la catégorie 2	18
Figure 10 : Exemple de coloration d'une souche de <i>E. coli</i> isolée de l'environnement présentant un aspect violet à classer dans la catégorie 2.....	19
Figure 11: Exemple de coloration d'une souche de <i>Klebsiella pneumoniae</i> issue d'une collection de référence présentant un aspect rose	19
Figure 12: Exemple de coloration d'une souche d' <i>Enterobacter aerogenes</i> issue d'une collection de référence présentant un aspect rose foncé	20
Figure 13: Exemple de coloration d'une souche de <i>Citrobacter freundii</i> issue d'une collection de référence présentant un aspect rose - rouge.....	20
Figure 14: Exemple de coloration d'une souche de <i>Citrobacter freundii</i> issue d'une collection de référence présentant un aspect rose - rouge.....	21

1 Rappel de la saisine, contextes réglementaire et normatif

Le Laboratoire d'Hydrologie de Nancy (LHN) a été saisi (annexe 2) le 17 mars 2014 par la Direction Générale de la Santé (DGS) d'une demande d'appui scientifique et technique (n°140003) relative à l'équivalence du projet de norme ISO 9308-1 (version 2014), pour la recherche et le dénombrement des *Escherichia coli* (*E. coli*) et des coliformes dans les eaux destinées à la consommation humaine, par rapport à la méthode de référence NF EN ISO 9308-1 (version 2000).

La directive 98/83/CE du 3 novembre 1998 relative à la qualité des eaux destinées à la consommation humaine prévoit la recherche de paramètres microbiologiques et fixe, à cette fin, les méthodes d'analyse, dites de référence, à utiliser (annexe III, partie 1). Une actualisation est intervenue en 2015¹. Cette directive impose ainsi l'utilisation de la norme ISO 9308-1 pour la recherche et le dénombrement des bactéries *Escherichia coli* (*E. coli*) et des bactéries coliformes dans les eaux destinées à la consommation humaine (EDCH). Jusqu'en 2014, la recherche des *E. coli* et des bactéries coliformes était basée sur une méthodologie décrite dans une version normative éditée en 2000 comprenant une filtration des eaux à analyser sur membrane, suivie d'une mise en culture sur une gélose de différenciation lactosée TTC (Chlorure de 2,3,5-triphényltétrazolium) permettant de mettre en évidence chez les bactéries isolées, celles en capacité de fermenter le lactose et ne disposant pas d'activité en lien avec la présence d'une oxydase (bactéries coliformes). Selon cette même méthode, les *E. coli* présentent les mêmes caractéristiques que les autres bactéries coliformes mais possèdent en plus la capacité à produire de l'indole après une phase d'incubation de 24 h à 44°C dans un bouillon tryptophane.

A la demande de certains états, un travail de révision de la norme ISO 9308-1 (2000) a été engagé au niveau de l'ISO. Il a abouti à une version révisée de la norme qui a été éditée en 2014. Cette nouvelle version a intégré des modifications profondes et en particulier une modification de la définition des bactéries coliformes et des *E. coli* avec par voie de conséquence un changement fondamental du principe analytique. Dans la version 2014 de l'ISO 9308-1, les bactéries coliformes et les *E. coli* sont à présent respectivement caractérisées par la présence d'activités enzymatiques caractéristiques. Il s'agit des activités β -D-galactosidase et β -D-glucuronidase dont la mise en évidence s'appuie sur une étape préalable de filtration de l'échantillon puis sur le dépôt des filtres à la surface d'un milieu gélosé CCA (Chromogenic Coliform Agar) incluant des substrats chromogènes qui peuvent être dégradés grâce aux activités enzymatiques spécifiques des bactéries ciblées. Il en

¹ Directive (UE) 2015/1787 de la commission du 06 octobre 2015 modifiant les annexes II et III de la directive 98/83/CE du Conseil relative à la qualité des eaux destinées à la consommation humaine.

résulte alors la libération d'un produit de dégradation coloré qui marque la présence des bactéries coliformes (coloration rose à saumon) et des *E. coli* (coloration bleue à violette).

Au moment de la parution de la nouvelle version de la norme, l'évaluation de la justesse et de la robustesse liées à ce nouveau principe analytique n'a fait l'objet que d'un nombre relativement restreint d'expérimentations sur des EDCH du territoire français. Dans ce contexte, et de manière à acquérir un retour d'expérience, le bureau de l'eau de la DGS a souhaité que le LHN organise une étude d'équivalence entre les deux méthodes décrites dans les deux versions de la norme. L'objectif étant d'appliquer la nouvelle méthodologie parue en 2014 sur un panel d'eaux d'EDCH représentatives du territoire français et d'évaluer l'impact sur les résultats du contrôle sanitaire français.

2 Méthode d'expertise en réponse à la question posée

Pour répondre à la demande du Ministère chargé de la Santé (saisine n°140003²), à partir de 2015, le LHN a procédé en trois temps.

Dans une première phase, le LHN a souhaité examiner l'équivalence des deux méthodes (version 2000 et 2014) au travers d'une étude nationale conduite sur des échantillons représentatifs, prélevés sur le territoire national et artificiellement contaminés. Six laboratoires accrédités (étude collaborative) ont réalisé des analyses dans ce contexte. Afin de comparer les deux modes opératoires, les résultats obtenus lors de cette première phase ont fait l'objet d'un traitement statistique indépendant selon les modalités décrites dans la norme NF EN ISO 17 994 de 2014.

Parallèlement le LHN a conduit une étude spécifique (laboratoire unique) se distinguant de la première phase par la mise en œuvre d'une large majorité d'échantillons naturellement contaminés. L'objectif de cette étude était d'évaluer la nouvelle méthode sur des échantillons naturels en condition classique d'utilisation par un laboratoire d'analyse exerçant des activités de contrôle sanitaire des EDCH. Les résultats obtenus ont été analysés en suivant le même traitement statistique que celui utilisé dans l'étude collaborative (selon NF EN ISO 17 994).

Enfin le LHN a également initié plusieurs études spécifiques visant à comprendre les résultats observés dans les deux études comparatives et à préciser les principales sources susceptibles de contribuer à un biais systématique au niveau des dénombrements de bactéries coliformes et de *E. coli*.

Préalablement à cette organisation le LHN a conduit dès la fin d'année 2014 un premier travail exploratoire visant à clarifier les informations décrites dans la nouvelle norme, notamment en ce qui concerne la description des colonies caractéristiques des bactéries coliformes et des *E. coli*. Ce premier travail a débouché sur la rédaction d'un catalogue de photographies de référence précisant l'aspect sur milieu CCA des bactéries coliformes et des bactéries *E. coli*. Ce catalogue a été diffusé à tous les laboratoires participants à l'étude collaborative au début de l'étude. Certaines conclusions de ce premier document ont été présentées en commission AFNOR T90D dès le mois de mai 2015.

² Disponible en annexe

3 Modalités d'organisation de l'étude d'équivalence

3.1 Pilotage et laboratoires participants

Le pilotage de l'étude a été organisé par le LHN. La sélection des points intégrés dans l'étude comparative a été opérée en tenant compte des informations relayées dans la base SISE-Eaux notamment pour les eaux naturellement contaminées. Le nombre de laboratoires participants a été déterminé en fonction du nombre de zones géographiques retenues dans le cadre de ce projet. Six laboratoires ont été sélectionnés en fonction de la zone géographique d'intérêt, mais également sur la base (i) d'une accréditation de la méthode de référence NF EN ISO 9308-1 (2000) et (ii) de l'agrément pour la réalisation des analyses du contrôle officiel des eaux. Il est important de signaler que tous les laboratoires retenus avaient déjà participé à d'autres études d'équivalence organisées par le LHN et de fait disposent des compétences sur les procédures à suivre. Le retraitement des données a été organisé par le LHN.

3.2 Déroulement de l'étude pour les laboratoires participants

Pour les laboratoires participants, le déroulement de l'étude s'est fait selon deux phases distinctes décrites ci-dessous

- La première phase de l'étude a eu pour objectifs de former et familiariser les opérateurs des laboratoires participants à l'utilisation de la nouvelle méthode mais aussi à la bonne compréhension du protocole d'évaluation de l'équivalence mis en place. De fait, les laboratoires participants ont reçu l'ensemble des informations et documents nécessaires à la réalisation des analyses. Un catalogue de photographies descriptives a été mis en place et envoyé afin de lever différentes ambiguïtés relatives à la reconnaissance des colonies d'intérêt. Les laboratoires ont pu tester le milieu de culture préalablement et effectuer des essais. Les laboratoires ont également réceptionné différents protocoles soit en lien avec l'organisation des essais soit en lien avec la préparation des eaux de dopage ainsi que des documents d'enregistrement permettant d'assurer la traçabilité des résultats.
- L'étude collaborative a été axée sur des échantillons d'eaux prélevés par les laboratoires et qui ont été "artificiellement contaminés" par dopage. Cette phase a permis de comparer les deux méthodes sur un nombre de bactéries ciblées. La contamination des échantillons a été réalisée par le biais d'eaux environnementales contenant des bactéries coliformes dont des *E. coli*. Pour cela, les laboratoires ont utilisé des eaux de surfaces et des eaux de rejets d'effluents de station de traitement des eaux usées (STEP). Ces différentes eaux ont été diluées à l'aide d'eau chlorée de manière à simuler un stress sur la flore bactérienne

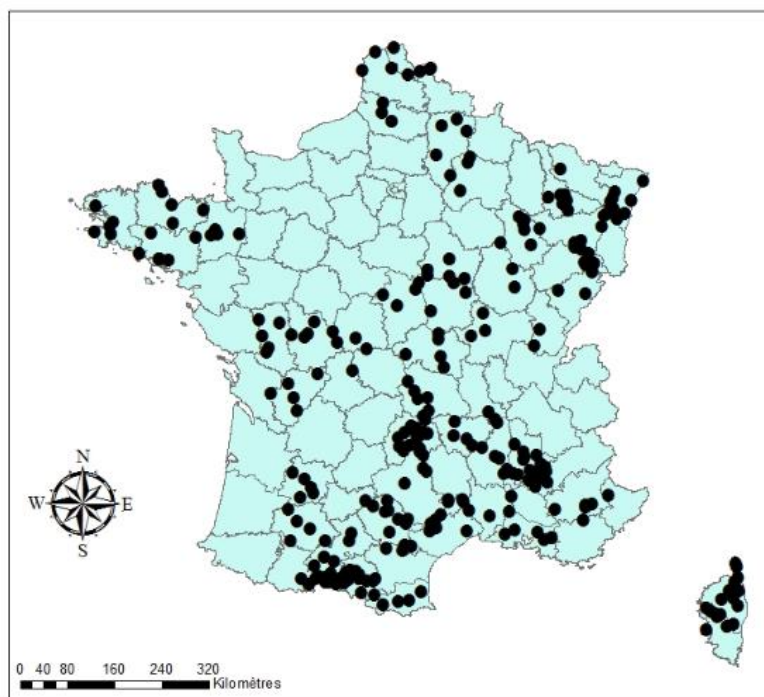
comparable à celui d'un réseau d'eau destinée à la consommation humaine. Les solutions ont été dans un second temps calibrées puis stockées à 4°C, avant dopage des échantillons hydriques à tester. Un protocole spécifique de préparation des eaux de dopage a été transmis à tous les laboratoires participants.

3.3 Sélection des échantillons à analyser

L'objectif visé en nombre d'échantillons à tester était de 200, incluant des eaux subissant différents modes de désinfection (chlore, bioxyde de chlore, UV, ozone, ...). Pour s'assurer de la représentativité des types d'eaux retenus, une extraction des données du contrôle sanitaire (SISE-Eaux) a permis de retenir des unités de distribution avec des typologies d'eaux différentes (physico-chimiques, microbiologiques et hydrologiques), couvrant si possible l'ensemble du territoire national. La sélection d'échantillons hydriques naturellement contaminés a également été favorisée pour tester les deux méthodes dans des conditions réelles similaires à celles retrouvées sur le terrain c'est-à-dire pendant les activités de contrôle sanitaire des EDCH. L'évaluation de l'équivalence sur ce type d'échantillon correspond selon la norme NF EN ISO 17 994 à un processus « idéal ». Dans ce cadre une extraction de données analytiques issues de la base nationale SISE-Eaux a été opérée sur l'ensemble du territoire afin de sélectionner dans un premier temps les sites potentiellement contaminés en bactéries coliformes.

Figure 1: Cartographie des sites représentatifs

(Données issues de la base nationale SISE-Eaux, source ministère de la Santé)



Tous les échantillons à contaminer ont été attribués aux laboratoires selon leur localisation géographique de manière à ce que chaque laboratoire participant puisse respecter les prescriptions

des normes de prélèvement, de transports et des délais de mise en analyse. De ce fait, le nombre d'échantillons attribué à chaque laboratoire a été fonction de sa localisation vis-à-vis des sites retenus.

3.4 Description des méthodes et tests d'identification opérés

3.4.1 Méthodes de détection comparées

- **Méthode NF EN ISO 9308-1 version 2000**

Dans cette étude la méthode NF EN ISO 9308-1 (2000) est la méthode prise pour référence. Pour rappel, le principe de cette méthode consiste à filtrer 100 mL d'eau destinée à la consommation humaine au travers d'une membrane filtrante d'une porosité de 0,45 µm, puis à incuber la membrane sur un milieu gélosé sélectif et à opérer la confirmation des bactéries par des tests adéquats. Selon cette norme de référence, les bactéries coliformes sont définies comme des bactéries pouvant former des colonies en aérobiose dans les (21 ± 3) h à (36 ± 2)°C sur un milieu de culture lactosé sélectif et répondent négativement au test oxydase. Pour les *Escherichia coli*, la production de l'indole à partir du tryptophane dans les (21 ± 3) h à (44 ± 0,5)°C complète la définition décrite ci-dessus. Pour l'essai standard, la norme autorise par la note 1 une extension de l'incubation pendant 24 heures supplémentaires pour augmenter la sensibilité de la méthode en cas d'absence de colonies à 24 h. Cette disposition est décrite dans l'actuel référentiel d'analyses du contrôle sanitaire des eaux publié par l'ANSES³. Ce délai d'incubation a été retenu dans le cadre de ces essais, soit un dénombrement après (44 ± 4) h (2 lectures : (21 ± 3) h et (44 ± 4) h). Comme l'autorise également la norme (note 2), la filtration d'une seconde prise d'essai a été systématiquement réalisée afin d'incuber une seconde membrane à 44 C. Conformément au LAB GTA 23 édité par le COFRAC et au référentiel ANSES, une tolérance de ± 1°C à 44°C a été acceptée dans le cadre de l'étude.

- **Méthode ISO 9308-1 version 2014**

La méthode décrite dans la nouvelle norme est la méthode à évaluer dans le cadre de cette étude. Il s'agit d'une méthode qui consiste à filtrer 100 mL d'eau sur une membrane de porosité 0,45 µm, et à déposer la membrane sur une gélose sélective contenant un substrat chromogène. Après

³ Référentiel d'analyses du contrôle sanitaire des eaux, ANSES/LHN/REF – CSE - Version 2 (Juillet 2018).

incubation (21 ± 3) h à (36 ± 2)°C la membrane est examinée. La durée d'incubation initialement fixée à 18 h a été modifiée par la parution d'un amendement⁴ à la norme ISO 9308-1 (2014) diffusé en décembre 2016 et portant notamment la durée minimum d'incubation de 18 à 21 h. Toutes les colonies présentant un aspect bleu foncé à violet sont considérées comme disposant d'une β -D-glucuronidase qui est une enzyme caractéristique des bactéries appartenant à l'espèce *E. coli*. Pour ces colonies caractéristiques aucun test complémentaire n'est nécessaire. Le dénombrement est directement reporté sur la fiche de paillasse. Il est assimilé au nombre total de *E. coli* détectées dans l'échantillon d'eau. Concernant les colonies roses saumon à rouge observées sur la membrane, elles doivent être considérées comme des coliformes présomptifs. Le principe de la détection des coliformes est basé sur leur capacité à cliver l'ortho-nitrophényl- β -galactoside (ONPG) *via* l'enzyme β -D-galactosidase après (21 ± 3) h d'incubation à une température de (36 ± 2)°C. Dans ce cadre, les colonies sont repiquées en vue d'opérer un test de révélation de l'oxydase. Les colonies présomptives présentant une réaction négative à ce test doivent être considérées comme des bactéries coliformes. La somme des bactéries roses saumon à rouge confirmées comme des coliformes et des colonies caractéristiques d'aspect bleu à violet détermine le nombre total de bactéries coliformes détectées dans l'échantillon d'eau analysé.

3.4.2 Document support d'aide à la sélection des bactéries coliformes et *E. coli* sur le milieu gélosé CCA (Norme ISO 9308-1 - 2014 et amendement A1 – 2016)

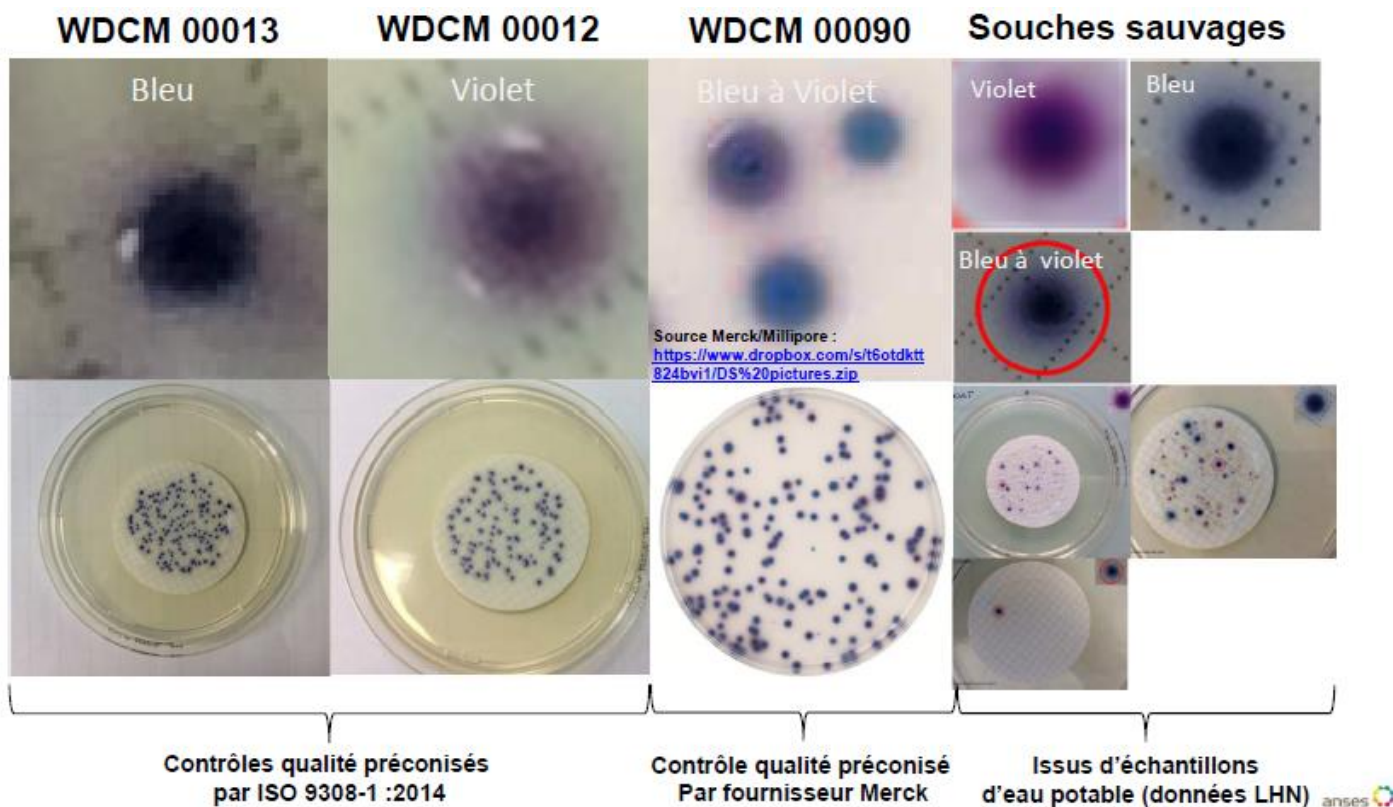
Préalablement à l'évaluation comparative du milieu chromogénique CCA décrit dans le principe analytique de la norme ISO 9308-1 (2014) sur les différentes eaux retenues, le LHN a conduit une pré-étude visant à dresser un catalogue de photographies de référence destiné aux opérateurs participant à l'étude. Ce catalogue a permis de préciser les différents aspects des bactéries coliformes et *E. coli* présumées à prendre en compte pour établir un dénombrement sur milieu CCA.

Selon la norme ISO 9308-1 (2014), les bactéries *E. coli* forment sur les gélose CCA des colonies d'aspect bleu foncé à violet. Nous avons vérifié ce point à l'aide de différentes souches de références de *E. coli* utilisées comme contrôle qualité et également avec des souches isolées d'échantillons naturellement contaminés. Dans les figures présentées ci-dessous nous avons dressé un résumé des différentes colorations pouvant être observées.

⁴ Amendement 1 à la norme ISO 9308-1 de septembre 2014 : ISO 9308-1/A1 (Décembre 2016).

Figure 2 : Coloration de différentes souches de *E. coli* de référence et de souches de *E. coli* sauvages isolées de l'environnement sur la gélose CCA

(Photographies issues de source du laboratoire ou du fournisseur)



Au cours de cette pré-étude, il a été constaté que les bactéries *E. coli* pouvaient présenter un polymorphisme dans les colorations exprimées sur la gélose CCA. Les colorations exprimées s'étendent du bleu au violet en passant par un intermédiaire bleu - violet. La reconnaissance de ces différentes colorations par l'opérateur peut être altérée en fonction du nombre et de la taille des colonies observées sur la gélose. Il a été décidé de catégoriser les bactéries en fonction de leur coloration. Une majorité des *E. coli* semble produire des colonies d'aspect bleu foncé qui présentent parfois des reflets violets (colonie d'aspect bleu violet - indigo). Il a été décidé d'associer les colonies présentant un aspect bleu foncé et bleu – violet à la catégorie 1. Différents exemples décrivant ces colonies ont été communiqués aux opérateurs. Ces exemples sont décrits ci-dessous. Dès lors chaque opérateur a eu pour consigne de reporter sur les feuilles de paillasse fournies pour l'étude et utilisées pour le dénombrement, les colonies d'aspect bleu à bleu foncé voire indigo dans la catégorie 1.

Figure 3 : Exemple de coloration d'une souche de *E. coli* issue d'une collection de référence présentant un aspect bleu foncé et « bleu – violet » à classer dans la catégorie 1

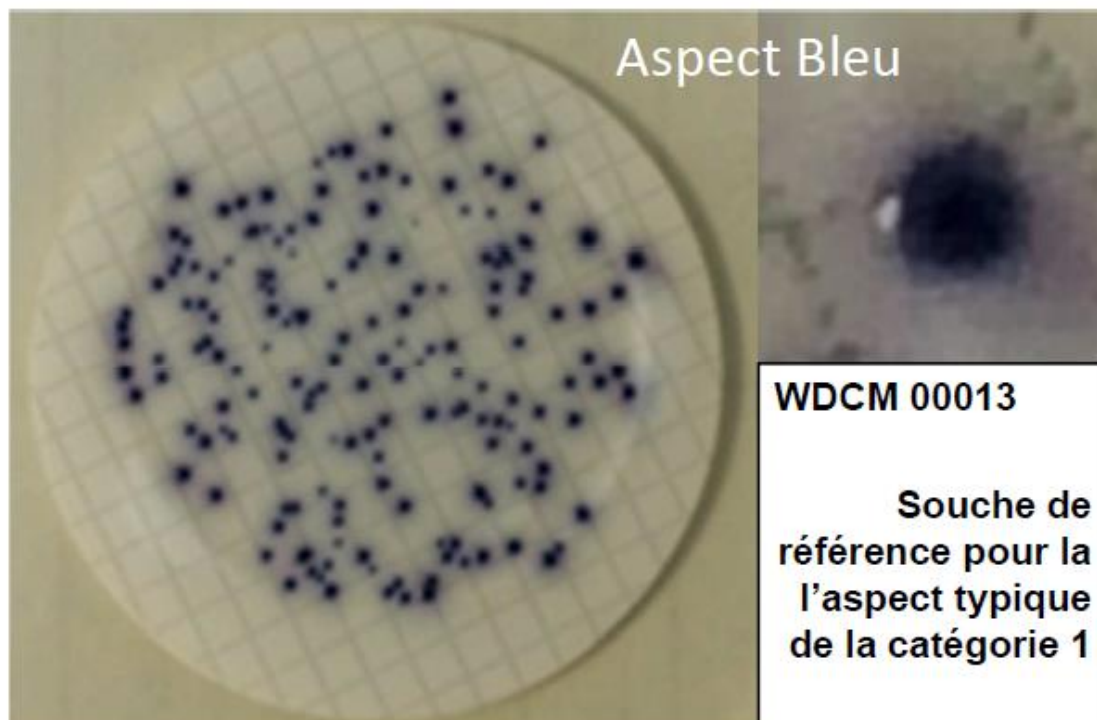


Figure 4: Exemple de coloration d'une souche de *E. coli* isolée de l'environnement présentant un aspect bleu à classer dans la catégorie 1

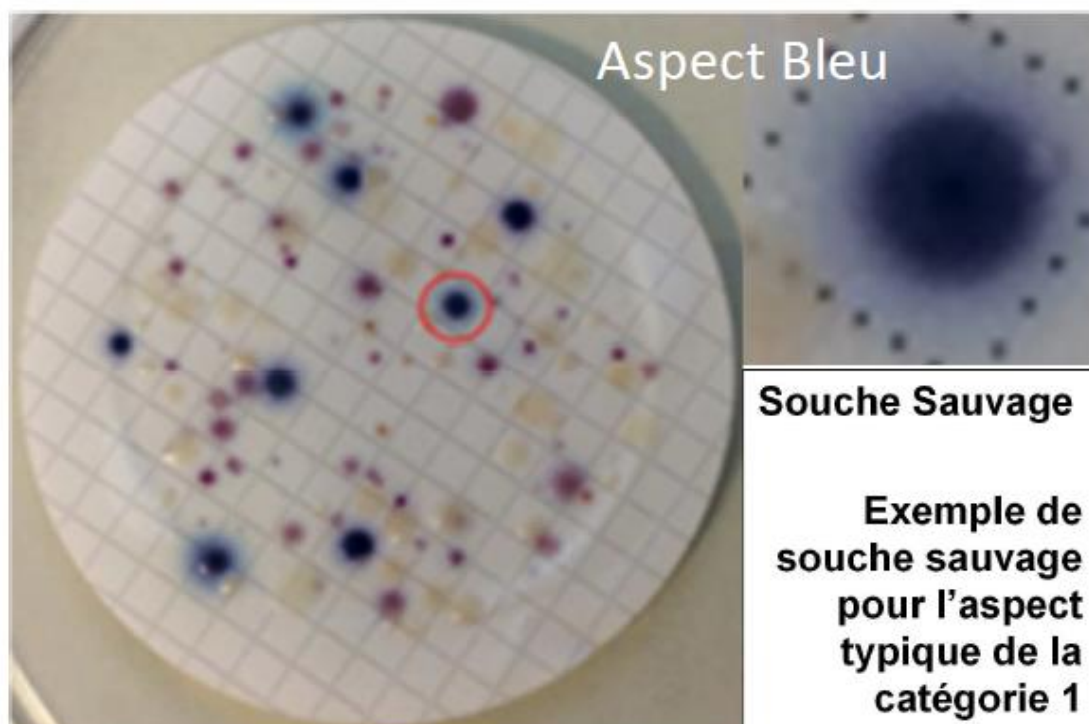


Figure 5: Exemple de coloration d'une souche de *E. coli* isolée de l'environnement présentant un aspect bleu à violet à classer dans la catégorie 1

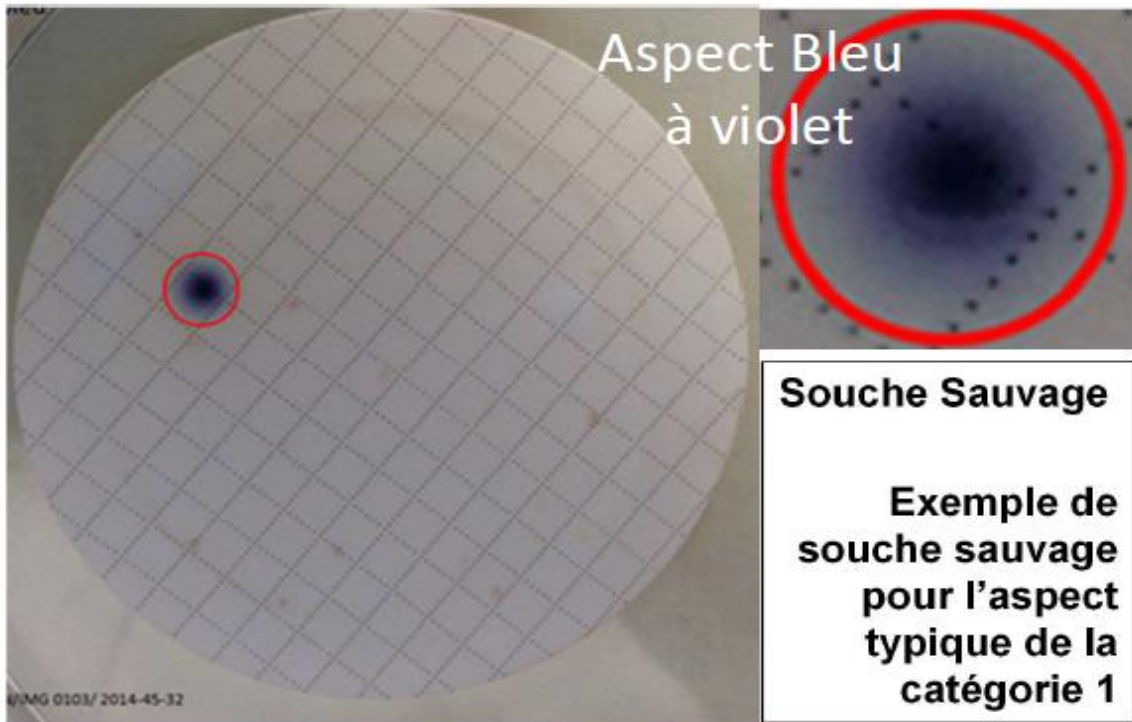


Figure 6: Exemple de coloration d'une souche de *E. coli* isolée de l'environnement présentant un aspect bleu à classer dans la catégorie 1

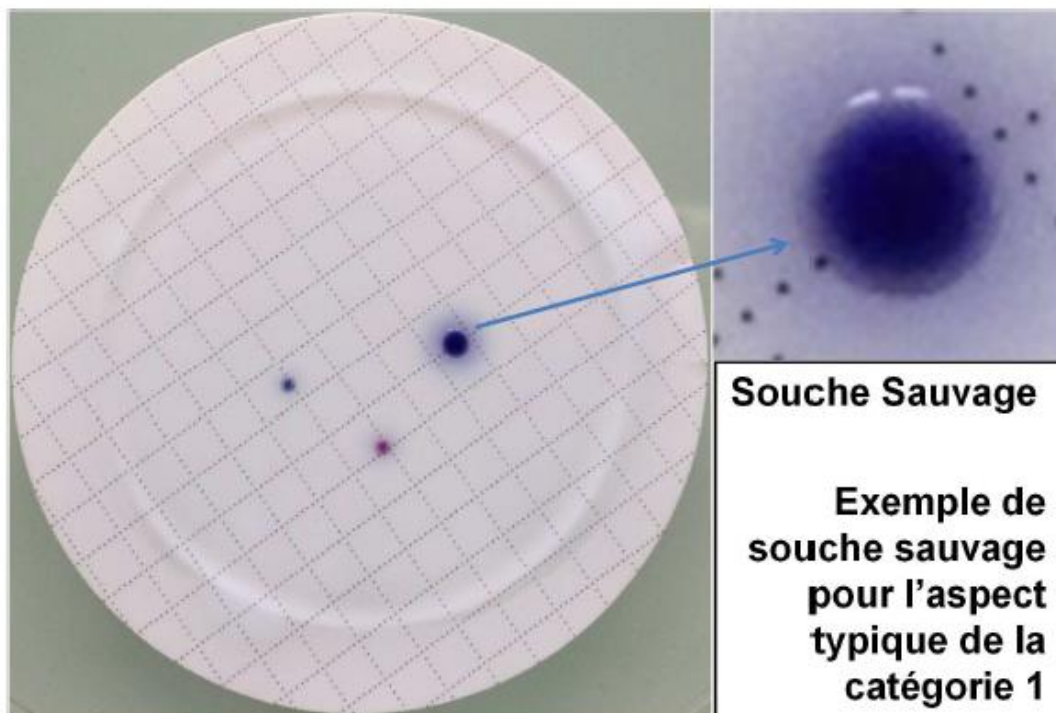
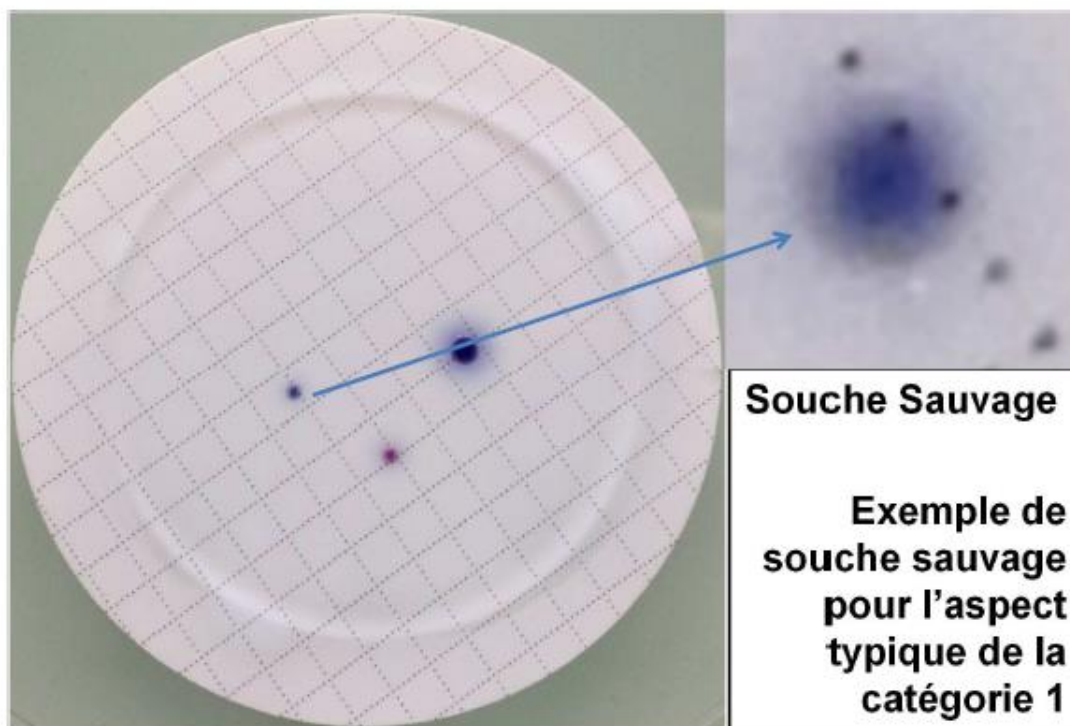


Figure 7: Exemple de coloration d'une souche de *E. coli* isolée de l'environnement présentant un aspect bleu – violet à classer dans la catégorie 1



L'aspect de la souche de référence (ex : WDCM 00012), mais aussi de certaines souches sauvages est plus ambiguë et se caractérise par une **coloration violette avec un centre plus foncé présentant une teinte bleu foncé**. Ces colonies se distinguent également de la coloration rouge à saumon qui caractérise les bactéries coliformes présumées. Sur les feuilles de paille fournies pour l'étude, ces colonies d'aspect violet à centre plus foncé ont été volontairement rattachées à la catégorie 2. Comme pour les colonies d'aspect bleu ou bleu - violet, la distinction peut s'avérer délicate si la concentration bactérienne est importante et que les colonies observées présumées sont de petites tailles. Différents exemples décrivant ces colonies ont été communiqués aux opérateurs. Ces exemples sont décrits ci-dessous. Comme pour les colonies de catégorie 1, les opérateurs en charge des analyses ont eu pour consigne de reporter sur les feuilles de paille les colonies bactériennes présentant ces aspects (catégorie 2).

Figure 8 : Exemple de coloration d'une souche de *E. coli* de référence présentant un aspect violet à classer dans la catégorie 2

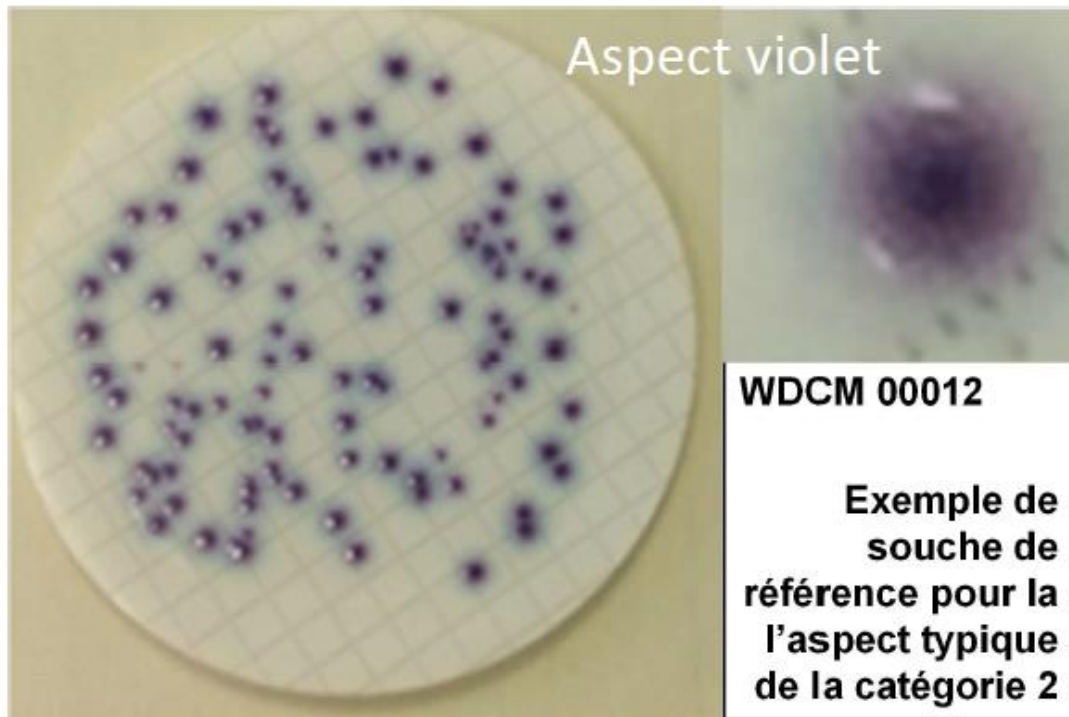


Figure 9: Exemple de coloration d'une souche de *E. coli* isolée de l'environnement présentant un aspect violet à classer dans la catégorie 2

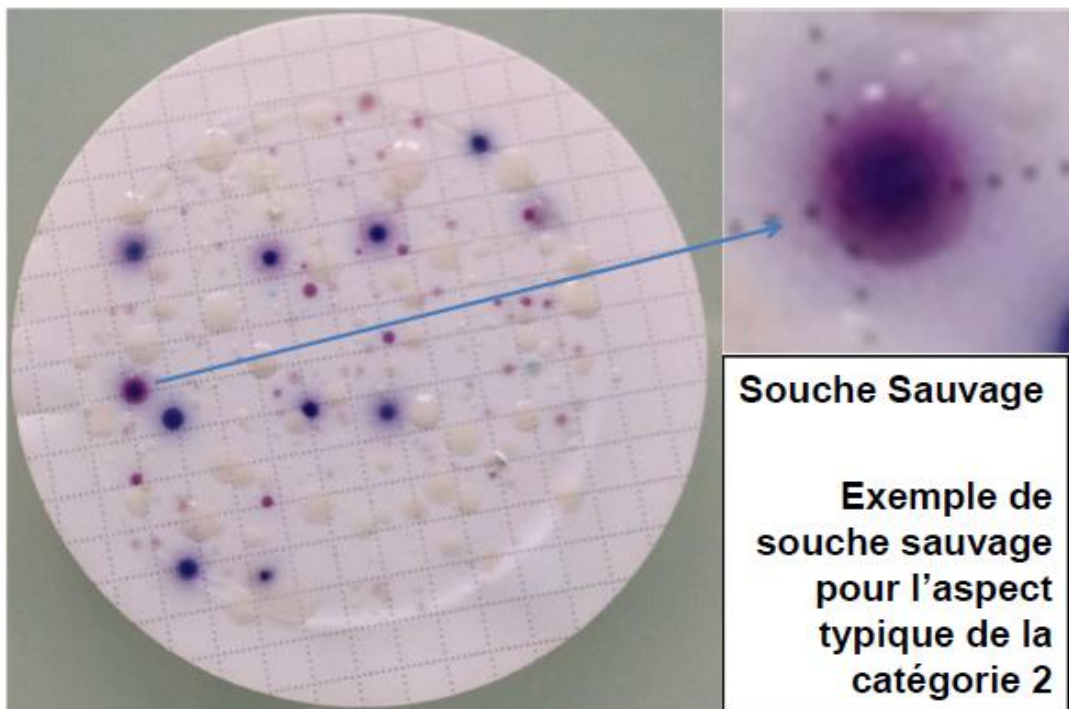
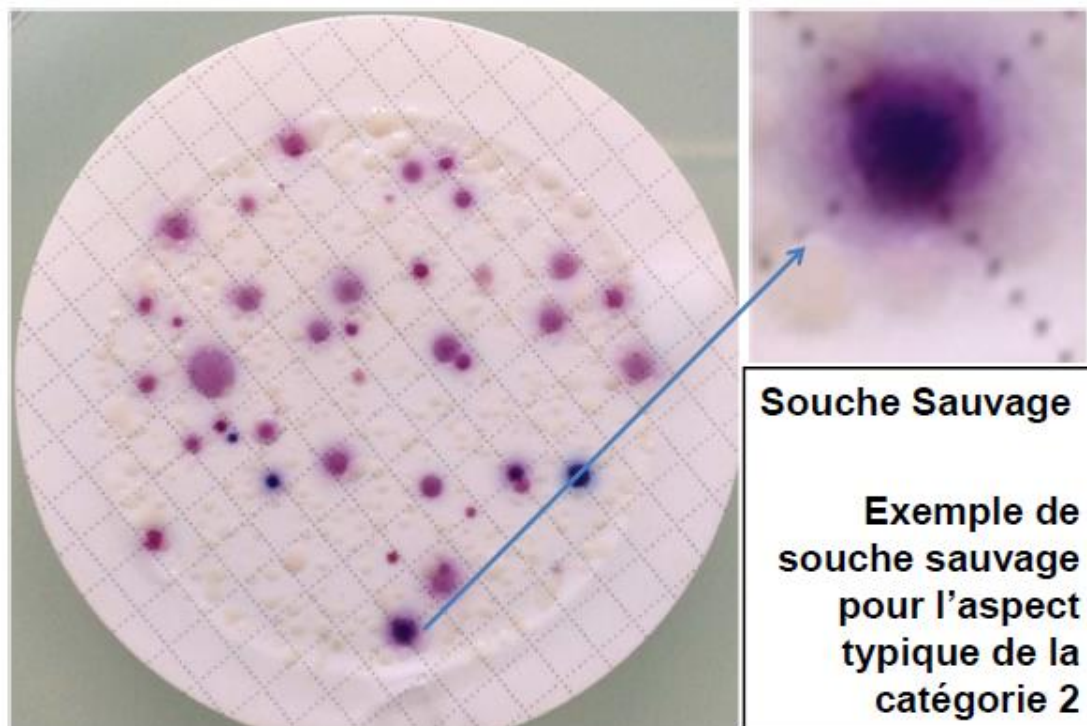


Figure 10 : Exemple de coloration d'une souche de *E. coli* isolée de l'environnement présentant un aspect violet à classer dans la catégorie 2



Il a été demandé à tous les opérateurs travaillant sur le projet d'effectuer lors des dénombrements une catégorisation des bactéries *E. coli* et de comptabiliser la somme des catégories 1 et 2 comme des bactéries *E. coli*. Lors des identifications bactériennes les laboratoires ont réalisé des tests de confirmation sur ces deux types de colonies.

Concernant les bactéries coliformes, la norme indique que les coliformes présomptifs forment des colonies d'aspect rose saumon à rouge. Selon les retours d'expérience acquis, les coliformes présomptifs peuvent prendre une coloration plus ou moins foncée. L'aspect de souches de référence montre par exemple que la coloration rose saumon à rouge est de plus en plus foncée respectivement pour *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes* et *Citrobacter freundii*. Il a été demandé au laboratoire de considérer comme des bactéries coliformes présomptifs les colonies qui présentent une coloration comparable à l'une de ces 3 souches de référence présentées ci-dessous.

Figure 11: Exemple de coloration d'une souche de *Klebsiella pneumoniae* issue d'une collection de référence présentant un aspect rose

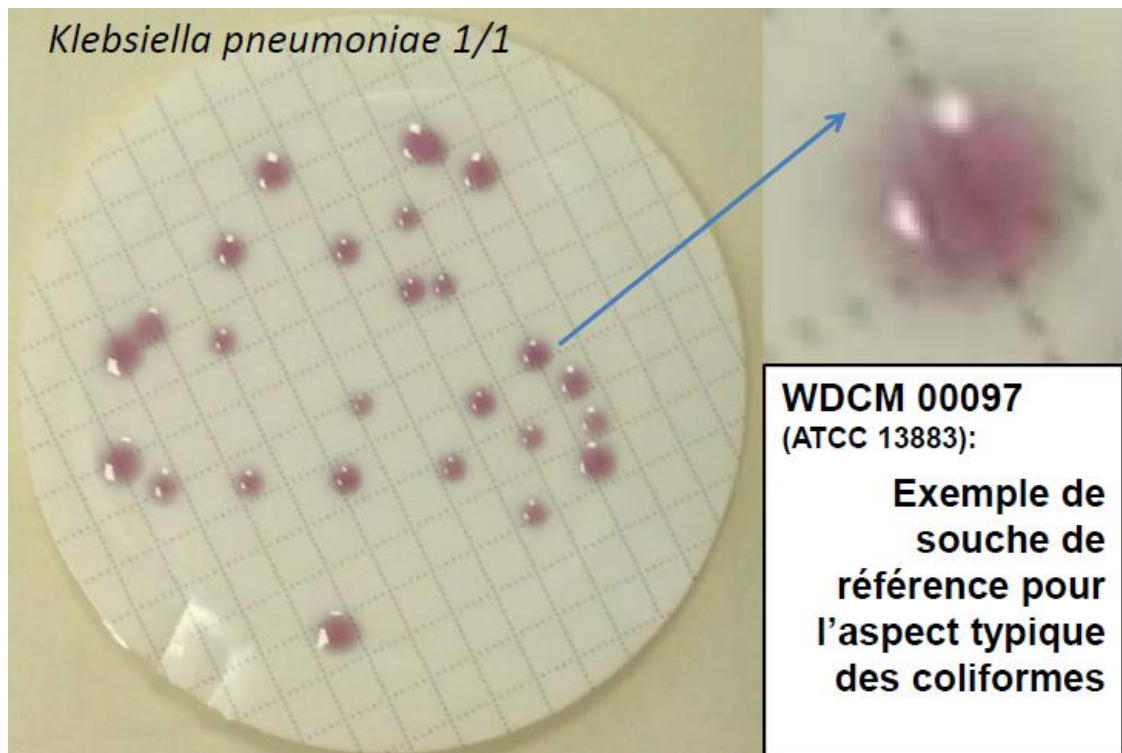


Figure 12: Exemple de coloration d'une souche d'*Enterobacter aerogenes* issue d'une collection de référence présentant un aspect rose foncé

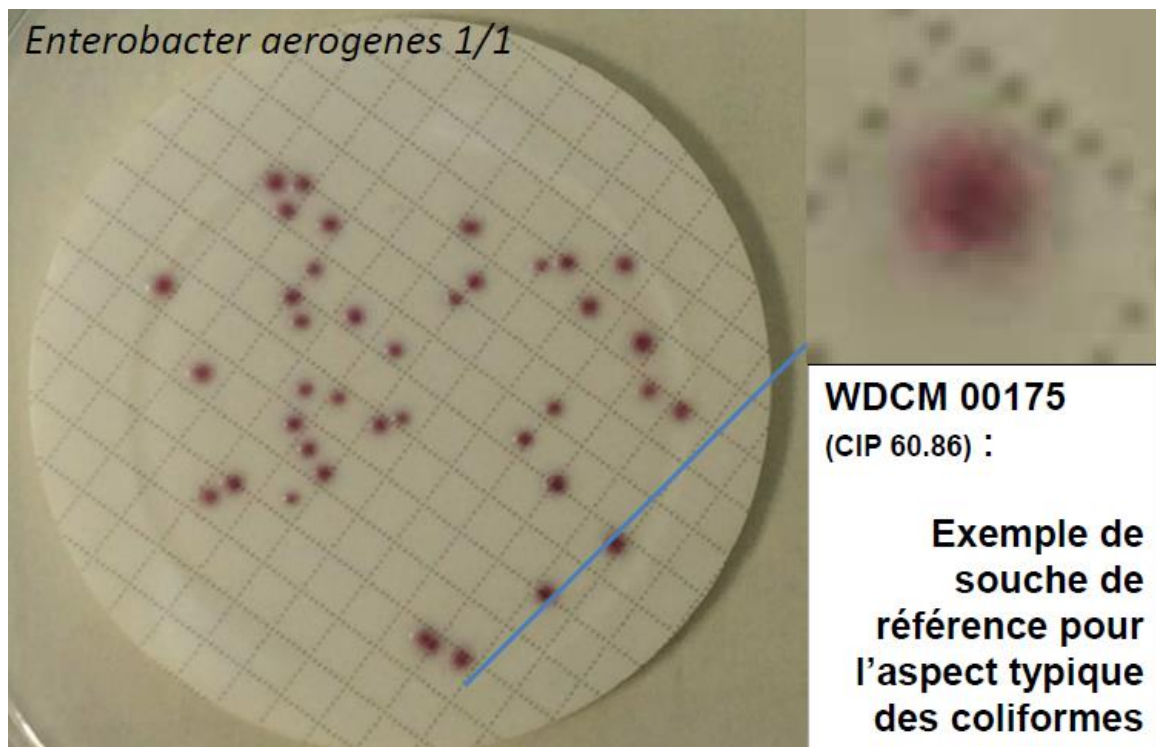


Figure 13: Exemple de coloration d'une souche de *Citrobacter freundii* issue d'une collection de référence présentant un aspect rose - rouge

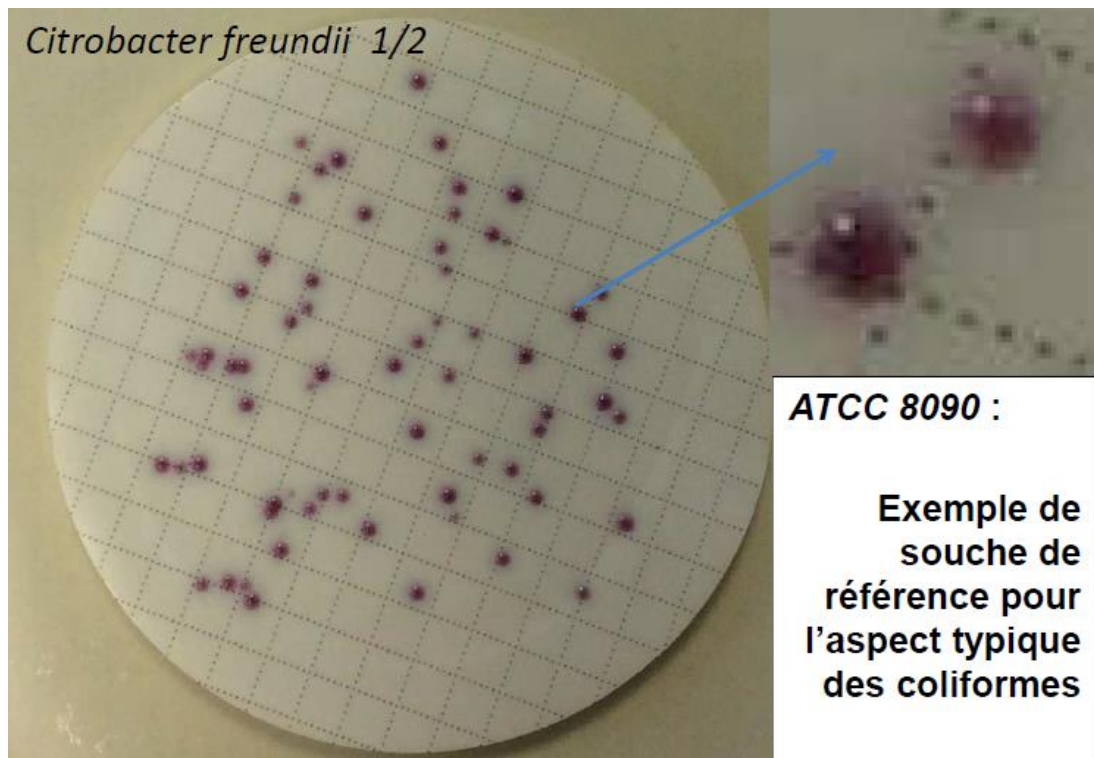
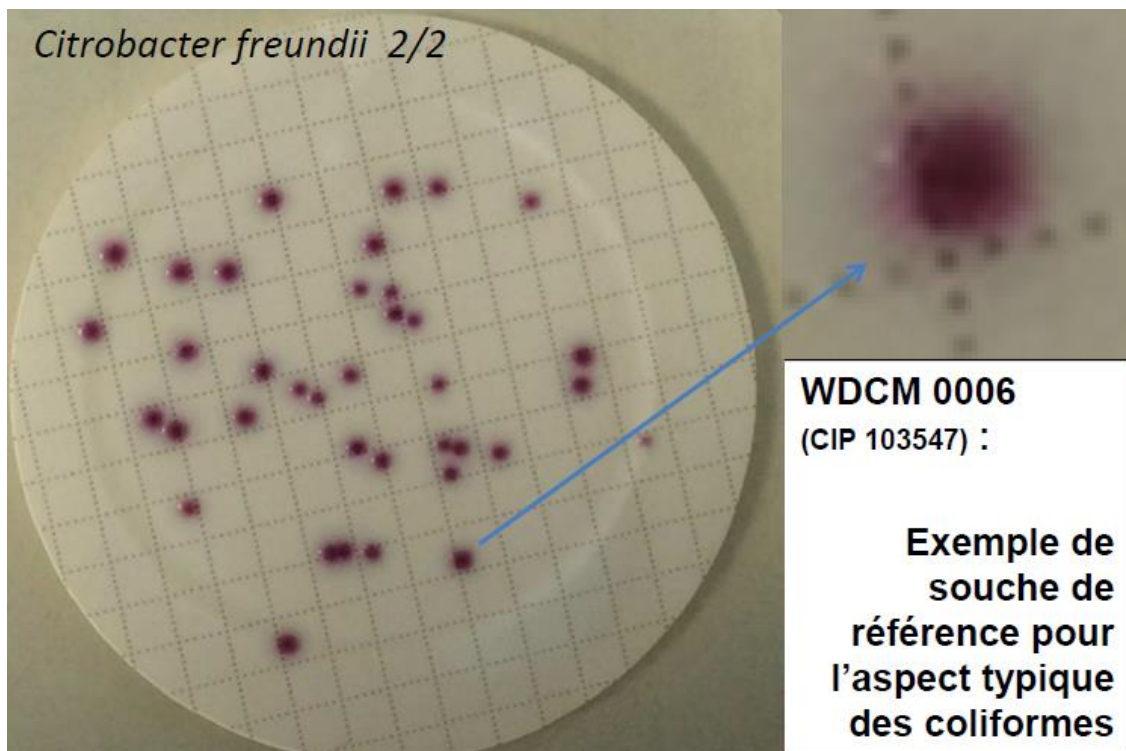


Figure 14: Exemple de coloration d'une souche de *Citrobacter freundii* issue d'une collection de référence présentant un aspect rose - rouge



3.4.4. Tests complémentaires de confirmation des bactéries

Concernant la norme NF EN ISO 9808-1 version 2000, il a été demandé aux laboratoires d'effectuer une recherche de β -D-galactosidase et de β -D-glucuronidase sur les bactéries à confirmer en complément des tests normatifs effectués. Ces tests de confirmation complémentaires ont été opérés sur les bactéries présomptives en même temps que les tests de confirmation de la norme étaient réalisés. Les résultats obtenus ont été renseignés pour chaque bactérie sur la feuille de paillasse associée à l'analyse.

Concernant la norme ISO 9808-1 version 2014, il a été demandé aux laboratoires d'effectuer une recherche de lactose sur les colonies coliformes roses à rouge à confirmer. Pour les colonies d'aspect bleu-foncé à violet assimilées à des *E. coli*, catégorisées sous les deux classes distinctes définies précédemment, les laboratoires ont dû systématiquement réaliser sur chaque catégorie, une recherche de l'oxydase, du lactose, de la thermotolérance à 44°C et de l'indole. Le nombre de confirmation à opérer était fonction du nombre de colonies observées. Ainsi les laboratoires ont eu pour consigne de tester toutes les colonies de catégorie 1 et 2 si leur nombre était inférieur ou égale à 10 et 10 colonies seulement si le nombre était supérieur à 10. Les résultats des tests complémentaires ont été reportés pour chaque catégorie et chaque bactérie dans la feuille de paillasse associée à l'échantillon. Il a également été demandé aux laboratoires d'isoler et de conserver en cryobilles stockées à -20°C, 3 bactéries coliformes et toutes les *E. coli* confirmées. De même les laboratoires ont eu pour consigne d'isoler des bactéries non caractéristiques (colonies blanches, transparentes ou présentant des colorations non décrites dans la norme ISO 9308-1 (2014)). Ces bactéries ont été transférées au LHN. Elles ont été remises en culture en vue d'une identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF.

Enfin, concernant les bactéries isolées des échantillons d'eaux d'alimentation naturellement contaminés et analysés par le LHN, toutes les bactéries détectées sur les géloses ont fait l'objet de tests de confirmation complémentaires et ont été identifiées par spectrométrie de masse MALDI-TOF.

A partir des feuilles de paillasse élaborées, il a été possible sur la base des résultats des tests de confirmation normatifs ou complémentaires effectués, d'obtenir des dénombrements corrigés et de préciser la notion de faux positifs et de faux négatifs pour chaque méthode.

4 Analyse statistique

L'analyse statistique a été opérée en utilisant les résultats de dénombrements obtenus par chaque méthode en tenant compte des prescriptions de la norme internationale NF EN ISO 17994 version 2014. Cette méthode repose sur la détermination de la Différence Relative exprimée en pourcentage entre chaque couple de comptages confirmés obtenus par les deux méthodes employées selon la formule :

$$x = [\ln(a) - \ln(b)] \times 100 \% \text{ avec } a \text{ et } b \text{ les valeurs de dénombrement mesurées pour chaque méthode}$$

Deux méthodes seront considérées comme quantitativement équivalentes (« sans différence ») si la Différence Relative moyenne mesurée sur des dénombrements confirmés par couple ne s'écarte pas de manière significative du zéro et si l'intervalle de confiance ne dépasse pas le niveau de la limite prédéterminée qui dans ce contexte est fixé à 10%. Dans le cadre de cette étude il a été décidé d'accepter l'équivalence de la méthode évaluée, chaque fois que sa performance moyenne était soit quantitativement équivalente, soit supérieure à celle de la méthode de référence. Nous avons indiqué pour chaque analyse effectuée, la différence relative obtenue ainsi que la déviation standard, l'erreur standard, l'incertitude élargie et enfin la tendance globale du test qui peut selon les résultats du test s'exprimer comme suit :

- Tendance globale positive (+) = méthode normative évaluée présentant un rendement de détection supérieur par rapport à la méthode NF EN ISO 9308-1 version 2000
- Tendance globale négative (-) = méthode normative évaluée présentant un rendement de détection inférieur à la méthode NF EN ISO 9308-1 version 2000
- Tendance globale non concluante (o) = résultat ne permettant pas de conclure par manque de données
- Tendance globale sans différence (MSD) = méthode équivalente sans différence

Préalablement à la réalisation des tests statistiques, une analyse critique des résultats de dénombrements a été réalisée. Ainsi par exemple pour chaque échantillon analysé, les jeux de dénombrements conduisant à un résultat de zéro par les deux méthodes ont été écartés de l'analyse.

Des combinaisons de dénombrement du type $(a, 0)$ et $(0, b)$ ont également été observées. Dans le cas de dénombrements nuls (0 UFC/100ml) obtenus uniquement par l'une des deux méthodes, il est important de préciser que ces derniers ont été conservés dans l'analyse statistique en calculant les différences relatives selon les formules suivantes :

-
- Lorsque le résultat est du type $(a, 0)$, la différence relative s'obtient à partir de :

$$x = \ln(a + 1) \times 100\%$$

- Lorsque le résultat est du type $(0, b)$, la différence relative s'obtient à partir de :

$$x = -\ln(b + 1) \times 100\%$$

L'analyse statistique principale a consisté à comparer les dénombrements confirmés obtenus par la méthode de référence NF EN ISO 9308-1 version 2000 à ceux obtenus par la méthode ISO 9308-1 version 2014 en suivant strictement les spécifications des tests de confirmation décrits dans les deux documents normatifs.

Dans un second temps il a été réalisé des analyses statistiques complémentaires sur des résultats de dénombrements corrigés obtenus à partir des tests d'identification complémentaires non normatifs.

5 Synthèse des résultats et observations constatées au cours de l'étude

Organisation de l'étude

La révision de la norme internationale ISO 9308-1 a conduit à modifier en 2014 la définition des bactéries coliformes et des bactéries *E. coli* isolées d'échantillons d'eaux d'alimentation. Ces bactéries appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae* sont définies dans ce document par la production de deux enzymes caractéristiques qui sont la β -D-galactosidase pour le groupe des bactéries coliformes à laquelle s'ajoute la β -D-glucuronidase pour l'espèce *Escherichia coli*. Le principe analytique décrit dans la norme ISO 9308-1 (2014) est basé sur une dégradation de substrats chromogènes en lien avec la présence de ces deux enzymes ce qui provoque la révélation d'une coloration caractéristique pour le groupe des bactéries coliformes ou pour l'espèce *E. coli*. L'avantage pour l'opérateur est de pouvoir rapidement dénombrer les colonies ciblées sans que des tests complémentaires de confirmation soient réalisés. C'est le cas pour les bactéries d'aspect bleu à violet qui sont directement assimilées à l'espèce *E. coli*. Pour les bactéries coliformes un test complémentaire visant à confirmer l'absence d'une activité oxydase pour les colonies présentant une coloration caractéristique reste nécessaire.

Au démarrage de ce travail d'évaluation, très peu de données étaient disponibles sur l'application et le retour d'expérience de ce nouveau protocole dans des eaux représentatives du territoire français. Un seul fournisseur de milieu de culture CCA, répondant aux caractéristiques de composition décrites dans la norme, était en mesure de commercialiser ce produit. De fait tous les résultats des laboratoires participant à l'étude ont été obtenus avec le milieu de ce fournisseur. Ce point est important à relayer car aujourd'hui d'autres sociétés commercialisent des milieux CCA que nous n'avons pas évalués.

L'objectif de cette étude a consisté à comparer le nouveau principe analytique à celui classiquement utilisé par les laboratoires accrédités et agréés dans le cadre du contrôle sanitaire des eaux d'alimentation qui s'appuie sur la NF EN ISO 9308-1 (2000). Pour cela il a été décidé d'évaluer le nouveau protocole en suivant les prescriptions édictées dans le référentiel normatif NF EN ISO 17994. Ce dernier référentiel est celui retenu par le groupe EMEG pour la réalisation d'études d'équivalence entre une méthode alternative et une méthode de référence. Il a été employé dans différentes études menées par d'autres états de l'union européenne sur différents principes analytiques. Il permet de comparer statistiquement les résultats de dénombrements obtenus par deux méthodes différentes ciblant les mêmes germes à partir d'échantillons hydriques sélectionnés, de manière à être représentatifs des eaux pouvant être distribuées au niveau d'un territoire.

L'évaluation de la méthode a été réalisée sur plus de 200 échantillons provenant pour plus d'un tiers de sites naturellement contaminés en bactéries coliformes et/ou en bactéries *E. coli* et pour le reste, d'échantillons d'eaux d'alimentation artificiellement contaminés par des eaux de surface ou des eaux issues de rejet de STEP contenant les populations bactériennes ciblées. La sélection des échantillons a été faite en tenant compte de différents critères (type de ressource, traitement, taille des stations, couverture nationale...). La participation de 6 laboratoires répartis géographiquement au niveau de différentes régions françaises a permis de tester la robustesse de la méthode en s'appuyant uniquement sur des échantillons d'eaux artificiellement dopés. Les eaux naturellement contaminées ont été analysées par un seul laboratoire qui a caractérisé toutes les bactéries retrouvées dans les eaux après analyses par les deux principes analytiques comparés. L'utilisation d'échantillons provenant de sites naturellement contaminés avait pour objectif de tester les deux méthodes dans des conditions proches de celles rencontrées lors de la réalisation d'analyses entrant dans le contrôle sanitaire. Ces échantillons ont permis de vérifier que le domaine d'application de la méthode évaluée était en adéquation avec la nature des échantillons à analyser. Il faut souligner qu'il existe à ce jour très peu de résultats d'évaluation menés sur ce type d'échantillon dans les dossiers d'équivalence soumis à la Direction Générale de l'environnement (DG env). Ce type d'échantillon est rare et de fait complexe à sélectionner. Sont le plus souvent employés, uniquement des échantillons d'eaux d'alimentation artificiellement contaminés par le biais d'eaux environnementales contenant les bactéries à cibler. Dans cette étude, des échantillons artificiellement contaminés ont également été utilisés en complément des échantillons naturellement contaminés. Pour ce faire les solutions de dopage de micro-organismes ont été préalablement soumis à un traitement physico-chimique de manière à « simuler » les situations stressantes pouvant être retrouvées sur le terrain. Par ailleurs, les laboratoires participants ont eu pour consigne d'utiliser différentes eaux de dopage (plusieurs eaux de surfaces et une eau de STEP) de manière à travailler avec des populations bactériennes d'origines diverses. Signalons qu'il a été constaté par plusieurs auteurs que l'origine des eaux, ou encore l'application ou non d'une étape supplémentaire visant à soumettre la population bactérienne à un stress, pouvaient avoir une influence sur le résultat final du test.

Concernant le nombre de bactéries ciblées sur les géloses, il est important de préciser qu'il a pu être différent entre le groupe des bactéries coliformes et les bactéries de l'espèce *E. coli* qui appartiennent également à ce groupe. Ce point est lié au fait que dans les eaux environnementales utilisées pour les dopages, le ratio entre les bactéries coliformes et les bactéries *E. coli* est déséquilibré, de sorte que le nombre de *E. coli* est toujours plus faible que le nombre de bactéries coliformes. Pour travailler avec des concentrations plus élevées de bactéries *E. coli*, il aurait été nécessaire de travailler avec des solutions de dopage ne contenant que cette espèce bactérienne. Or cette solution ne nous est pas apparue adéquate car elle est non représentative de ce qui peut

être retrouvé dans l'environnement. Ainsi pour l'espèce *E. coli* le nombre de bactéries dénombrées dans les échantillons artificiellement contaminés, a le plus souvent oscillé de 10 à 20 UFC par 100 mL selon la méthode. Pour les eaux naturellement contaminées le nombre de *E. coli* a pu être encore plus faible. De fait, pour certains échantillons ou la population bactérienne ciblée était présente en faible concentration, des résultats comparatifs du type positif pour une méthode et négatif pour l'autre méthode ont pu être observés. Dans le cadre de cette étude nous avons décidé de conserver ces résultats et de les exploiter car ils contribuent à fournir une information sur les performances d'une méthode dans des conditions d'utilisation proches de celles observées en routine et dans un cadre réglementaire où un échantillon est déclaré non conforme dès qu'une seule bactérie cible est détectée.

Dans ce travail, une attention particulière a été portée à la confirmation des colonies bactériennes observées sur chaque gélose (CCA vs TTC) et la vérification de leur assimilation correcte au groupe des coliformes et à l'espèce des *E. coli* par l'intermédiaire d'outils de spéciation (spectrométrie de masse MALDI-TOF) ou la réalisation de tests de confirmation phénotypiques. Rappelons que pour l'espèce *E. coli*, à l'inverse de ce qui est décrit dans la norme NF EN ISO 9308-1 (2000), la norme ISO 9308-1 (2014) ne requiert aucun test de confirmation complémentaire. Ce travail de caractérisation supplémentaire a permis de corriger les dénombrements retrouvés par chaque méthode grâce à un recalcul prenant en compte l'ensemble des informations de confirmation collectées. Les confirmations ont été réalisées sur des bactéries coliformes, des bactéries *E. coli* mais aussi sur des bactéries non caractéristiques ce qui nous a permis de comprendre les limites de chaque méthode.

Enfin préalablement à l'organisation de ce travail d'évaluation comparatif, le LHN a acquis des premiers résultats au travers d'une pré-étude réalisée à partir d'un milieu chromogénique CCA commercial. Les premières expérimentations, réalisées sur différentes souches bactériennes référencées (souche ATCC, contrôles positifs intraséries...) ou isolées d'échantillons d'eaux d'alimentation nous ont permis de dresser un premier constat et des tendances analytiques, que nous avons synthétisé dans un document présenté en commission AFNOR T90D et qui a été communiqué à l'ISO par l'intermédiaire de cette commission AFNOR. Ces premiers résultats ainsi que des photographies de référence sont venues alimenter la mise en place d'un document cadre destiné aux laboratoires qui ont participé à l'étude d'évaluation.

Bactérie Coliformes

Les résultats obtenus à partir des échantillons d'eau testés dans cette étude et concernant le dénombrement des bactéries coliformes (exprimé en UFC/100 mL), ont clairement démontré que l'utilisation des géloses chromogénique CCA en accord avec la norme ISO 9308-1 (2014) conduisait à un dénombrement plus important que lorsqu'une gélose TTC est employée en accord avec la norme NF EN ISO 9308-1 (2000). Les résultats de cette étude sont globalement concordants avec les tendances relayées dans différents dossiers publiés au niveau européen pour ce paramètre microbiologique avec ces deux méthodes.

Au cours de ce travail nous avons également démontré qu'à partir des échantillons hydriques analysés, les Différences Relatives mesurées entre les deux méthodes (version 2014 vs 2000 de la norme) pouvaient significativement diminuer lorsque les bactéries étaient identifiées par spectrométrie de masse MALDI-TOF. Ce dernier point tendrait à indiquer qu'un certain nombre de bactéries déclarées en première instance comme des bactéries coliformes n'appartiendraient pas en réalité à ce groupe lorsque le milieu proposé dans la nouvelle norme ISO 9308-1 (2014) est utilisé (présence de faux positifs). De fait il se produirait une surestimation du nombre de bactéries coliformes mesurés dans les échantillons d'eaux. A titre d'exemple, au cours de l'étude il a été possible d'identifier plusieurs échantillons naturellement contaminés, déclarés à tort non conformes en première instance, du fait de la présence de bactéries coliformes dont l'appartenance à ce groupe bactérien a été infirmée par les tests de confirmation complémentaires. Il existe peu d'informations sur ce point au niveau des études actuellement publiées. En revanche, différents dires d'experts, intervenus lors d'échanges au sein de groupes techniques en microbiologie, ont rapporté cette possibilité. Ainsi par exemple des utilisateurs du milieu chromogénique CCA pour l'analyse d'eaux embouteillées ont relayé en commission AFNOR T90D une problématique de faux positifs concernant des souches d'*Acinetobacter*. Ces souches sur ce milieu seraient capables de croître sous un aspect caractéristique (rose), et l'étape de confirmation par la réalisation d'un test oxydase ne permettrait pas d'écarter leur appartenance au groupe des bactéries coliformes. La détection de ces souches produirait dès lors des résultats non conformes que l'identification par des méthodes de spéciation pourraient invalider.

Dans ce travail nous avons également été interpellé par la présence de bactéries caractéristiques (roses) sur les milieux CCA, ne présentant pas d'activité oxydase, et identifiées par spectrométrie de masse MALDI-TOF au genre des *Bacillus*. Ces bactéries après repiquage et réalisation d'un test à l'oxydase peuvent être assimilées à tort en première instance au groupe des bactéries coliformes. Ce point a été peu relayé au travers de la communauté scientifique. Le genre *Bacillus* correspond à des bactéries sporulées aérobies largement distribuées dans l'environnement et les milieux hydriques. Il existe de très nombreuses espèces qui peuvent circuler et résister dans ces milieux tout au long de l'année. Au travers d'une étude spécifique, organisée sur ce genre bactérien, nous avons confirmé cet artefact sur quelques souches de *Bacillus* issues de collections cultivées sur

milieu CCA à 36°C pendant 24 h. Nous avons également constaté que ces bactéries répondaient négativement au test de l'oxydase et qu'elles pouvaient ainsi être injustement assimilées à des bactéries coliformes. Il est important de préciser que tous les *Bacillus* testés et repiqués sur gélose CCA ne présentent pas une coloration systématiquement rose. Les *Bacillus* sont des bactéries Gram+. La réalisation de coloration de Gram permettrait d'écartier le risque de déclarer un faux positif. Ce dernier test pourrait être employé pour limiter leur impact sur le dénombrement. Au sein du groupe EMEG, il a été signalé que certains laboratoires d'autres états membres, pratiquant l'analyse de l'eau, ont recours à ce test afin de limiter ce type d'interférence lorsque le principe analytique de la norme ISO 9308-1 (2014) est employé.

Un autre genre bactérien n'appartenant pas aux entérobactéries a également attiré notre attention. Il s'agit du genre *Aeromonas* qui a été retrouvé dans de nombreux échantillons. Les *Aeromonas* sont des bactéries ubiquitaires de l'environnement. Elles sont retrouvées dans tous les milieux de l'environnement (sol, eaux...). Sur les géloses chromogéniques CCA, ces bactéries apparaissent en grande majorité roses avec des tonalités qui peuvent varier fortement. A l'inverse des *Bacillus*, la croissance de ce genre bactérien sur gélose CCA est un phénomène reconnu. Il est clairement explicité dans la nouvelle norme ISO 9308-1 version 2014. Pour limiter l'impact sur le dénombrement final, cette version de la norme préconise de réaliser un repiquage des bactéries présomptives de coliformes en vue d'opérer un test oxydase. Les *Aeromonas* présentent en majorité une réponse positive à ce test ce qui permet de les exclure rapidement du dénombrement. Néanmoins s'il est possible d'écartier aisément ces bactéries des dénombrements finaux lorsque leur densité est faible, ce point devient plus compliqué à gérer lorsque leur densité est importante notamment si le nombre de bactéries coliformes présentes sur la gélose se trouve en faible concentration. En effet, compte tenu du nombre de bactéries à repiquer (jusqu'à une dizaine en général), en présence d'un nombre important d'*Aeromonas*, la présence d'un faible nombre de bactéries coliformes pourrait être occultée, entraînant potentiellement une sous-estimation pour le dénombrement de ce groupe. Pour limiter ce risque, lorsque le nombre de bactéries présomptives (bactéries roses) est important, il conviendrait d'augmenter le nombre de colonies à repiquer.

Bactérie Escherichia coli

Concernant les bactéries *E. coli*, nous avons démontré que les résultats mesurés étaient clairement dépendants de la coloration des colonies observées après concentration des eaux et

ensemencement sur les géloses chromogéniques CCA (ISO 9308-1 : 2014). Dès le début de ce travail, nous avons constaté que des souches de référence pouvaient exprimer des colorations différentes sur ces géloses. Les *E. coli* peuvent présenter un aspect bleu foncé ou un aspect violet. Ces différentes colonies sont dès lors considérées comme des *E. coli* sans qu'aucun test de confirmation complémentaire ne soit réalisé pour vérifier leur réelle appartenance à l'espèce *E. coli*.

Concernant les colonies d'aspect bleu foncé (catégorie 1) sur le filtre après incubation de 21 à 24 h à 36°C sur la gélose CCA, les résultats de caractérisation par spectrométrie de masse MALDI TOF, ont confirmé l'appartenance de ces bactéries à l'espèce *E. coli*. Ceci a été vérifié sur un panel représentatif de souches isolées des échantillons naturellement et artificiellement contaminés. Les résultats des tests phénotypiques classiquement utilisés pour caractériser ces bactéries avec le principe détaillé dans la norme NF EN ISO 9308-1 de 2000 (tests de l'oxydase, de la thermotolérance et de l'indole), ont également confirmé ce point. Pour ces colonies d'aspect caractéristique et comme l'indique la norme ISO 9308-1 (2014), il ne semble donc pas nécessaire d'avoir recours à une étape de confirmation pour fiabiliser le dénombrement. Cette coloration caractéristique (bleue foncée) apporte un avantage indéniable à la méthode notamment lorsqu'est présente une flore abondante potentiellement interférente et limitante pour aboutir à un dénombrement. Les bactéries *E. coli* d'aspect bleu foncé restent aisément identifiables parmi les autres bactéries du tapis bactérien, permettant ainsi d'identifier rapidement un potentiel risque sanitaire en lien avec la présence de ces bactéries indicatrices de pollution fécale. Cependant lorsque seules les *E. coli* de catégorie 1 sont prises en compte, l'exploitation statistique basée sur les dénombrements obtenus par les deux méthodes à partir des échantillons artificiellement et naturellement contaminés, révèle une Différence Relative négative pour la méthode CCA. Ces résultats indiquent clairement que dans cette configuration (débombrement uniquement des colonies d'aspect bleu foncé), les dénombrements obtenus avec la méthode chromogénique CCA sont nettement plus faibles que ceux obtenus avec la méthode TTC. Ce constat a également été confirmé lorsque l'identification par MALDI TOF a été utilisée pour confirmer l'appartenance à l'espèce *E. coli* des bactéries dénombrées par les deux principes analytiques. La seule prise en compte des colonies caractéristiques d'aspect bleu foncé dans le dénombrement final de la méthode CCA entraîne une sous-estimation de la détection des bactéries *E. coli*.

Concernant les colonies d'aspect violet (catégorie 2) sur le filtre après incubation de 21 à 24 h à 36°C sur la gélose CCA, à l'inverse de ce qui a été observé pour la catégorie 1, nous avons démontré qu'en l'absence de tests de confirmation, il existait un risque de conclure à des résultats erronés. En l'absence de tests de confirmation (tel que le préconise actuellement la nouvelle méthodologie), il se produit une augmentation non négligeable de la proportion de faux positifs en lien avec la présence de bactéries d'aspect caractéristique n'appartenant pas à l'espèce *E. coli*. Si la coloration violette des colonies permet de proposer un filtre de sélection aisé pour le repiquage, les nuances

associées à cette coloration peuvent rapidement entraîner des erreurs de dénombrements. La coloration est une notion purement subjective et dépendante de l'appréciation de l'opérateur pouvant entraîner un biais important dans la sélection des bactéries (Cf. travaux réalisés par AGLAE⁵). Des différences de perception peuvent apparaître entre des colonies d'aspect rose foncé à rouge et le violet clair par exemple. Cette perception semble dépendre de la taille de la colonie observée, de la densité des colonies, de la coloration des colonies voisines, mais aussi de la coloration de la membrane en cas de présence de matière en suspension ou de certains minéraux. Il est indispensable dans ce domaine que l'opérateur acquière de l'expérience sur des échantillons représentatifs et que les laboratoires mettent à disposition des utilisateurs un guide descriptif avec des photographies de référence, tenant compte de l'analyse d'échantillons plus ou moins riche en flore bactérienne. De manière à diminuer ces résultats de faux positifs lorsque ces bactéries d'aspect violet sont observées, il est nécessaire de mettre en place une étape supplémentaire de confirmation. Un test de la recherche de l'indole en condition de thermotolérance pourrait contribuer à réduire cet artéfact. L'identification des espèces par spectrométrie de masse MALDI-TOF pourrait également être utilisée comme méthode de confirmation. La mise en place d'une catégorisation des colonies assimilées à des bactéries *E. coli* selon leur coloration (catégorie 1 : colonie d'aspect bleu et catégorie 2 : colonie d'aspect violet) permettrait une organisation plus aisée de la sélection des souches à confirmer et aiderait les opérateurs à aboutir à un dénombrement final plus fiable sur ce type de gélose. Il est important de préciser que seules les bactéries *E. coli* d'aspect violet seraient à confirmer.

D'un point de vue statistique, nous avons démontré qu'il se produisait une diminution de la Différence Relative lorsqu'il était réalisé une confirmation des bactéries *E. coli* (toutes catégories regroupées ; bactéries d'aspect bleu foncé + bactéries d'aspect violet foncé) par des tests complémentaires non normatifs (test indole) ou après identification des espèces par spectrométrie de masse MALDI-TOF. En présence de ces tests complémentaires, les résultats d'évaluation statistique mesurés évoluent d'une Différence Relative positive non concluante à une Différence Relative négative significative qui indique que les deux méthodes ne sont pas équivalentes pour le dénombrement des bactéries *E. coli* dans les eaux d'alimentation. Cette tendance a été confirmée quel que soit le type d'eau utilisé (eaux artificiellement ou naturellement contaminées). Elle est également constatée même si les bactéries *E. coli* dénombrées sur le milieu TTC décrit dans l'ancienne version de la norme NF EN ISO 9308-1 (2000) sont confirmées par des tests complémentaires par le biais de la β -D-glucuronidase ou par spéciation par spectrométrie de masse. Ces résultats indiquent que le nouveau

⁵ VANHEMS C., GUARINI P., COURTADE E., 2016. Recherche et dénombrement des coliformes et d'*Escherichia coli* : incertitude associée à la couleur des colonies observées sur milieu CCA. Communication (Poster) aux Journées Informations Eaux, Poitiers.

principe analytique (gélose CCA) provoque une surestimation du nombre de bactéries *E. coli* décelées dans les échantillons d'eaux quand les bactéries d'aspect bleu foncé (catégorie 1) et d'aspect violet (catégorie 2) sont assimilées directement à l'espèce *E. coli*. La surestimation mesurée est liée aux bactéries d'aspect violet considérées à tort comme des *E. coli*. Ces résultats confirment que lorsque la méthode CCA est utilisée, il est nécessaire de vérifier l'appartenance des bactéries d'aspect violet (catégorie 2) à l'espèce *E. coli*.

Selon les données obtenues dans cette étude, il apparaît que même si le mode opératoire de la NF EN ISO 9308-1 (2014) venait à évoluer pour intégrer des étapes de confirmation complémentaires visant à corriger la surestimation, il provoquerait au final une sous-estimation du risque sanitaire par rapport à l'utilisation de la méthode TTC. Il existe très peu d'informations concernant l'impact de la coloration des bactéries dans les résultats des tests statistiques mis en oeuvre lors des précédentes études d'équivalence effectuées dans les dossiers européens. Le retour d'expérience sur ce point est encore peu disponible. De même très peu d'informations ont été relayées dans le document normatif publié par l'ISO à ce sujet.

Plusieurs autres colonies d'aspect bleu sur les géloses CCA ont attiré notre attention au cours de cette étude. Il s'agit de bactéries présentant une coloration bleue turquoise. Nous avons démontré par identification MALDI TOF que dans la majorité des cas ces bactéries n'appartenaient pas au genre *Escherichia*. Dans ce contexte nous avons décidé volontairement de ne pas les retenir dans le dénombrement final. Très peu d'informations sont actuellement disponibles sur ces bactéries présentant cette coloration bleue particulière.

Nous avons confirmé à partir des données de caractérisation par spectrométrie de masse lors d'une d'étude spécifiquement organisée sur des souches de collection de *E. coli*, que des isolats de cette espèce pouvaient également ne pas respecter la coloration décrite dans la norme ISO 9308-1 (2014). C'est le cas notamment de bactéries *E. coli* pathogènes O157. Ces bactéries sur les géloses chromogéniques CCA apparaissent roses et sont assimilées à des coliformes car elles n'expriment pas de β -D-glucuronidase. Les *E. coli* O157 sont reconnues comme pouvant provoquer un résultat de type faux négatif. Ce point est clairement décrit dans la version 2014 de la norme. Actuellement peu de données existent sur la circulation de ce pathogène dans les eaux environnementales qui ont été incriminées dans des épidémies d'origines hydriques par le passé.

Enfin à partir des échantillons étudiés dans ces travaux, il a également été possible de retrouver des bactéries *E. coli* parmi des colonies bactériennes blanches de petite taille. Il faut signaler que ces cas particuliers sont négligeables sur la globalité du nombre de tests effectués et qu'il est également possible de se trouver dans des situations équivalentes lorsque la version 2000 de la norme NF EN ISO 9308-1 est utilisée. Nous n'avons pas recherché à savoir pourquoi ces bactéries n'exprimaient pas de coloration sur la gélose CCA.

Autres bactéries décelées et interférences

Le retour expérimental acquis au cours de l'essai pas les opérateurs ayant pratiqué la méthodologie décrite dans la norme ISO 9308-1 (2014) pour l'analyse échantillons d'eaux a mis en évidence qu'il était possible de retrouver de très nombreuses bactéries sur les géloses chromogéniques CCA présentant des colorations ou des aspects non caractéristiques des bactéries coliformes et des bactéries *E. coli*. La présence de colonies transparentes et blanches parfois en grande densité a questionné les utilisateurs (figures 4, 9 et 10 par exemple). Il a été confirmé que ces colonies appartenaient à différents genres bactériens qui n'avaient aucun lien avec les bactéries coliformes ou les *E. coli*. Ces bactéries n'ont bien évidemment pas été comptabilisées dans le dénombrement final. La présence en grand nombre de cette flore non caractéristique a pu provoquer une interférence gênant la lecture ou les repiquages des bactéries ciblées voir même, a pu empêcher le rendu de résultats définitifs en cas d'envahissement complet des membranes après 24 h d'incubation à 36°C. Ce phénomène d'envahissement n'est pas exclusivement observé sur le milieu chromogénique CCA. Il apparait également lorsque les géloses TTC sont employées. Cependant la double incubation des géloses TTC d'une part à 36°C et d'autre part à 44°C a permis de limiter significativement l'impact de la flore interférente. A partir des échantillons étudiés dans ces travaux, il ressort que l'incubation complémentaire réalisée à 44°C décrite dans la méthode NF EN ISO 9308-1 (2000) aurait permis d'aboutir à un résultat de dénombrement interprétable plus fréquemment que lorsque la gélose CCA a été employée. Il a été possible à partir des échantillons naturellement contaminés prélevés sur différents sites représentatifs, d'estimer sur les échantillons dont le résultat s'est avéré ininterprétable après incubation à 36°C, qu'il aurait été au final possible de rendre un résultat avec la gélose TTC incubée à 44°C pour plus de 40 % des échantillons. L'incubation de la gélose chromogénique CCA à 44°C pourrait être une alternative bénéfique permettant de limiter ce problème d'interférence. Une étude scientifique publiée en 2018 par Josic *et al.*, et axée principalement sur des eaux de baignade a montré l'intérêt de cette température pour limiter le développement de la flore interférente sur milieu CCA pour ce type d'eau. La réalisation d'une incubation complémentaire à 44°C pour le milieu CCA pourrait par ailleurs apporter des informations sur la présence de coliformes thermotolérants autres que *E. coli*, et donc fournir au gestionnaire une information sur la présence potentielle d'autres coliformes fécaux. Pour les bactéries *E. coli*, l'élévation de la température d'incubation à 44°C pourrait peut-être limiter la présence des bactéries d'aspect violet responsables de faux positifs. Enfin cette évolution, si elle venait à être évaluée et acceptée permettrait de pouvoir utiliser la norme ISO 9308-1 (2014) modifiée en conséquence, pour l'analyse d'échantillons d'eaux minérales. Rappelons en effet que pour ces eaux particulières, la directive 2009/54/CE du Parlement européen et du Conseil du 18 juin 2009 relative à l'exploitation et à la mise dans le commerce des eaux minérales naturelles précise que le dénombrement des bactéries coliformes et des *E. coli* doit être réalisé systématiquement à 37°C et 44,5°C. A ce jour,

seule la norme NF EN ISO 9308-1 (2000) utilisant le milieu TTC décrit un principe analytique qui permet de répondre à cette exigence.

6 Conclusion

Les résultats obtenus au cours de cette étude d'évaluation sur plus de 200 échantillons d'eaux d'alimentation artificiellement ou naturellement contaminés mettent en avant qu'il est indispensable de faire évoluer le protocole décrit dans la nouvelle version de la norme ISO 9308-1 version 2014 de manière à fiabiliser les dénombrements des bactéries coliformes et *E. coli* dans les eaux d'alimentation au risque de déclarer injustement des résultats non conformes ou de sous-estimer un risque sanitaire lors de leurs analyses. Ce travail de révision devrait être réalisé de manière collégiale en tenant compte des retours d'expérience des différents utilisateurs par le groupe en charge des bactéries coliformes et des *E. coli* au niveau de la commission de normalisation (WC4) de l'ISO.

Date de validation du rapport : 18 septembre 2018

7 Bibliographie

7.1 Publications et communications

JOZIC S., *et al.*, (2018). Performance characteristics of the temperature-modified ISO 9308-1 method for the enumeration of *Escherichia coli* in marine and inland bathing waters. *Mar Pollut Bull.* 135 : 150-158.

VANHEMS C., GUARINI P., COURTADE E., 2016. Recherche et dénombrement des coliformes et d'*Escherichia coli* : incertitude associée à la couleur des colonies observées sur milieu CCA. Communication (Poster) aux Journées Informations Eaux, Poitiers.

7.2 Normes

NF EN ISO 9308-1 (Septembre 2000) Qualité de l'eau – Recherche et dénombrement des *Escherichia coli* et des bactéries coliformes - Partie 1 : méthode par filtration sur membrane. Indice de classement T90-414

ISO 9308-1 (septembre 2014) Water quality – Enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria – Part 1 : Membrane filtration method for water with low bacterial background

NF EN ISO 17 994 (avril 2014) Qualité de l'eau - Exigences pour la comparaison du rendement relatif des micro-organismes par deux méthodes quantitatives. AFNOR (indice de classement T90-462)

7.3 Législation et réglementation

PARLEMENT EUROPEEN. Directive 98/83/CE modifiée du Conseil du 3 novembre 1998 relative à la qualité des eaux destinées à la consommation humaine

PARLEMENT EUROPEEN. Directive 2009/54/CE du Parlement européen et du Conseil du 18 juin 2009 relative à l'exploitation et à la mise dans le commerce des eaux minérales naturelles

PARLEMENT EUROPEEN. Directive (UE) 2015/1787 de la commission du 06 octobre 2015 modifiant les annexes II et III de la directive 98/83/CE du Conseil relative à la qualité des eaux destinées à la consommation humaine.

ANNEXES

Annexe 1 : Groupe EMEG (European Microbiology Expert Group)

Depuis fin 2013, le comité européen traitant de la qualité de l'eau potable a suggéré la mise en place d'un groupe en charge des expertises méthodologiques en lien avec la directive sur l'eau de consommation ; le groupe d'experts européens en microbiologie a ainsi été officialisé en tant que «European Microbiology Expert Group for water quality» ou EMEG group.

Le mandat du groupe peut être consulté sous la rubrique mandat de la page web qui lui est dédiée (<https://ec.europa.eu/jrc/communities/community/emeg/page/mandate>).

Au-delà des missions directement en lien avec la directive sur l'eau de consommation (directive n° 2015/1787 du 06/10/15) et l'évaluation de méthodes alternatives selon la norme EN ISO 17 994 pour les eaux de consommation, le groupe a également pour objectif d'apporter son expertise sur les aspects microbiologiques (soutien, commentaires) potentiellement soulevés par les activités en lien avec les autres directives (par exemple : directive eaux de baignades, directive eaux usées urbaines, directive eaux souterraines).

Concernant ce dernier point, le 17 juillet 2015, la commission européenne a signifié au groupe EMEG par voie de courrier (réf. Ares(2015)3024092) :

- la possibilité de solliciter des experts spécialisés en eau de baignade dans l'objectif de traiter les dossiers d'équivalence en lien avec le contrôle sanitaire des eaux de baignade,
- que pour l'établissement des dossiers d'équivalence, la norme EN ISO 17 994 pourrait s'appliquer dans sa dernière version (indépendamment de la version datée de 2004 dans la décision 2009/64/EC) sous réserve de formalisation de ce point par le comité européen en charge de la qualité de l'eau.

Ainsi le groupe EMEG est l'entité compétente pour l'évaluation des dossiers d'équivalence produits selon la norme EN ISO 17 994 dans le cadre de méthodes concernant les eaux de consommation mais également dans le cadre de méthodes concernant des mesures sur les eaux de baignade.

Annexe 2 : lettre de saisine n°140003



MINISTÈRE DES AFFAIRES SOCIALES ET DE LA SANTÉ

Direction générale de la santé
Sous-direction « Prévention des risques
liés à l'environnement et à l'alimentation »
Bureau « Qualité des eaux »
DGS/EA 4 N° 96

Personnes chargées du dossier :
Bérengère LEDUNOIS
Tél. : 01.40.56.69.18
Mél. : berengere.ledunois@sante.gouv.fr

Béatrice JEDOR
Tél. : 01.40.56.45.99
Mél. : beatrice.jedor@sante.gouv.fr

Paris, le 17 MAR. 2014

Le Directeur général de la santé

à

Monsieur le Directeur du Laboratoire
d'hydrologie de Nancy de l'Agence nationale
de sécurité sanitaire (ANSES/LHN)
40, rue Lionnois
54000 NANCY

Objet : Demande d'appui scientifique et technique – Equivalence du projet de norme ISO 9308-1 (version 2014), pour la recherche et le dénombrement des *Escherichia coli* et des coliformes dans les eaux destinées à la consommation humaine, par rapport à la méthode de référence NF EN ISO 9308-1 (version 2000)

N/Réf. : DGS N° 140003 (numéro de dossier à rappeler dans toute correspondance)

La directive 98/83/CE du 3 novembre 1998 relative à la qualité des eaux destinées à la consommation humaine prévoit la recherche de paramètres microbiologiques et fixe, à cette fin, les méthodes d'analyse, dites de référence, à utiliser (annexe III, partie 1). Cette directive impose ainsi l'utilisation de la norme ISO 9308-1 pour la recherche et le dénombrement des *Escherichia Coli* et des coliformes totaux dans les eaux destinées à la consommation humaine (EDCH). Cette méthode est basée sur une filtration sur membrane, suivie d'une mise en culture dans une gélose de différenciation.

A la demande de certains Etats, un travail de révision de cette norme a été engagé depuis plusieurs années introduisant une modification du principe de détection des *Escherichia coli* et des coliformes totaux qui serait basé dorénavant sur l'utilisation d'un milieu chromogénique sélectif de l'activité de deux enzymes : la β -D-glucuronidase (exprimée par les *E. coli*) et la β -D-galactosidase (exprimée par les coliformes).

Dans le cadre de la procédure de vote des Etats siégeant à l'Organisation internationale de normalisation (ISO), la France a voté négativement sur ce projet de norme notamment en raison :

- du faible nombre d'études assurant de l'équivalence de cette nouvelle norme vis-à-vis de la version en vigueur actuellement ;
- de son domaine d'application plus limité que celui de l'actuelle norme utilisée pour le contrôle officiel (utilisation uniquement en présence d'une faible flore bactérienne interférente) ;
- de la non identification, en tant qu'*E.coli*, des souches entérohémorragiques (*E. coli* O157:H7 par exemple) qui n'expriment pas la β -D-glucuronidase (ces bactéries seraient uniquement identifiées en tant que coliformes).

Malgré un vote négatif de la France, et d'autres pays représentés au niveau de l'ISO, cette norme est en phase finale d'approbation au niveau de cette dernière instance et du Comité européen de normalisation (CEN). La publication de cette norme, au niveau français, est prévue au dernier trimestre 2014. Elle viendra alors se substituer à l'actuelle version de la norme NF EN ISO 9308-1.

Dans ce contexte et en l'absence de recul sur l'impact de cette nouvelle norme notamment vis-à-vis de l'évolution du nombre de non-conformités en eau distribuée pour les paramètres *E.coli* et coliformes totaux, je sollicite votre expertise scientifique et technique afin de réaliser une étude d'équivalence de la norme ISO 9308-1 version 2014 vis-à-vis de la norme actuellement en vigueur, selon les recommandations de la norme ISO 17994 (norme citée comme norme de référence pour évaluer de l'équivalence de méthodes microbiologiques dans le projet de révision de l'annexe III de la Directive 98/83/CE). Cette étude d'équivalence devra être réalisée sur des EDCH représentatives du territoire national, conformément aux recommandations de la norme ISO 17994.

1/2

14, avenue Duquesne 75350 Paris 07 SP

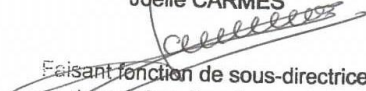
Les résultats de cette étude permettront de mieux appréhender l'éventuelle discontinuité dans les résultats d'analyse de ces paramètres microbiologiques habituellement utilisés comme indicateurs de contamination fécale pour déterminer la qualité sanitaire de l'eau et d'engager, si besoin, en fonction des résultats obtenus, des discussions avec la Commission européenne.

Compte tenu de l'état d'avancement du processus d'approbation du projet de norme au niveau de l'ISO et du CEN, il semble essentiel que cette étude débute dans les plus brefs délais afin d'obtenir des résultats avant la mise en application de cette norme.

Je vous précise enfin que ce dossier est enregistré à la Direction générale de la santé sous le numéro 140003 et l'intitulé suivant :

**DEMANDE D'APPUI SCIENTIFIQUE ET TECHNIQUE SUR L'EQUIVALENCE DU PROJET DE
NORME 9308-1 (VERSION 2014), POUR LA RECHERCHE ET LE DENOMBREMENT DES
E. COLI ET DES COLIFORMES DANS LES EAUX DESTINEES A LA CONSOMMATION HUMAINE,
PAR RAPPORT A LA METHODE DE REFERENCE NF EN ISO 9308-1 (VERSION 2000)**

Joëlle CARMÈS


Faisant fonction de sous-directrice
de la prévention des risques
à l'environnement et à l'alimentation

Notes