

NOTE TECHNIQUE N°7

RECHERCHE ET DENOMBREMENT DE *LEGIONELLA* SPP ET DE *LEGIONELLA PNEUMOPHILA* RETOUR D'INFORMATION - EIL A.G.L.A.E. - SUR LA MISE EN ŒUVRE DE LA NF T 90-431 (2014)

Ce document est diffusé à titre informatif et est basé sur des résultats et observations d'essais interlaboratoires d'A.G.L.A.E.

DECEMBRE 2015

Rédacteurs :

- Olivier MOLINIER
- Mylène MARECHAL

Association AGLAE
Parc des Pyramides
427 rue des Bourreliers
59320 Hallennes lez Haubourdin
☎ 03 20 16 91 40
contact@association-aglae.fr
www.association-aglae.fr

RESUME

Le 1^{er} novembre 2014, l'AFNOR a diffusé une nouvelle version de la norme NF T90-431 relative à la recherche et au dénombrement de *Legionella* spp et de *Legionella pneumophila*. Des modes opératoires aux calculs des rendements de référence, des modifications majeures ont été apportées à cette nouvelle version de la norme portant sur la « Méthode par ensemencement direct et après concentration par filtration sur membrane ou centrifugation ».

A.G.L.A.E. a accompagné ses adhérents dans la mise en place de la nouvelle version de la norme en les informant des changements, en attirant leur attention sur les mises au point et les validations qu'ils allaient devoir mettre en œuvre, en leur proposant de participer à des essais interlaboratoires spécifiques sur le nouveau protocole et enfin, en leur restituant les premiers éléments des performances obtenues sur la nouvelle méthodologie.

Dans la présente note technique, A.G.L.A.E. présente un bilan des observations réalisées en 2015 sur la pratique de la nouvelle norme NF T90-431 (2014) sur eaux propres et eaux sales. Différents points sont abordés :

- L'évolution du nombre d'adhérents mettant en œuvre en routine la nouvelle version NF T 90-431 (2014) ;
- La dispersion des mesures répétées observée lors de l'étape de filtration de 10 ml sur eaux propres ;
- Les rendements de référence déclarés par les laboratoires pour les essais sur eaux propres de 2015 ;
- Le temps d'agitation par vortex déclaré par les participants pour le cas des eaux sales.

Ces informations sont des « instantanés » sur la mise en œuvre des modalités de la norme révisée, ceci au premier et au troisième trimestre 2015, qui permettront à tout laboratoire de positionner ses performances par rapport à l'ensemble de la profession.



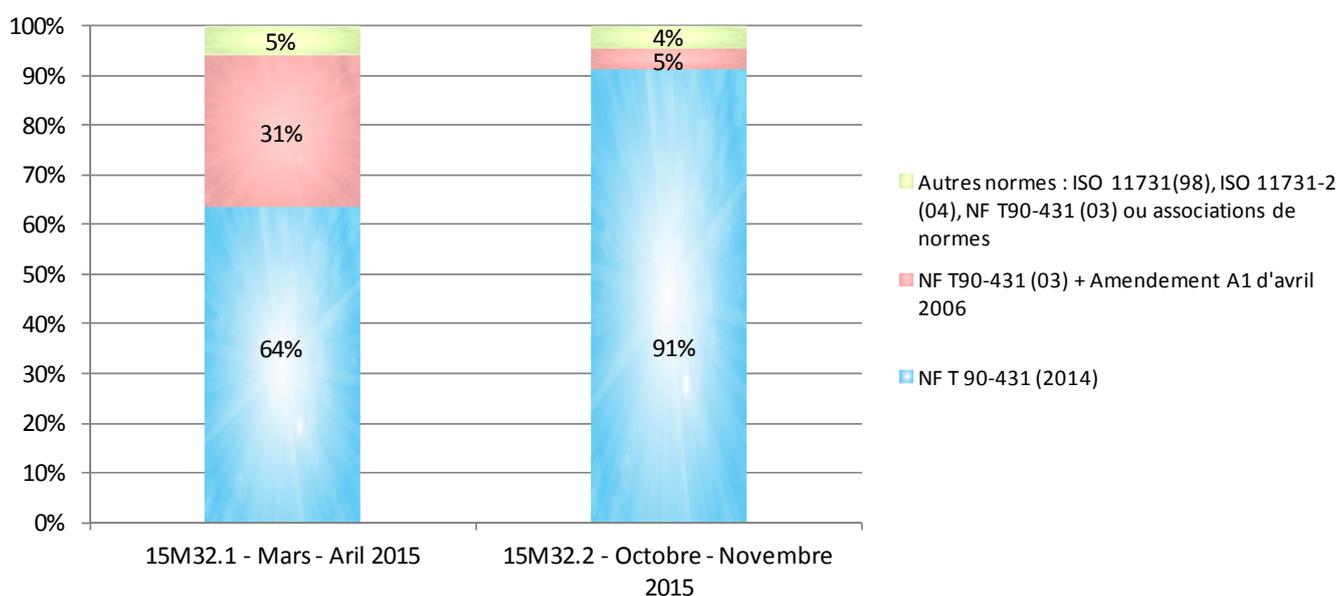
SOMMAIRE

1. EVOLUTION DU NOMBRE DE LABORATOIRES APPLICANT LA VERSION NF T90-431 (2014) SUR EAUX PROPRES	4
2. LA REPETABILITE DES ETAPES DE FILTRATION SUR EAUX PROPRES	4
3. LES RENDEMENTS DE REFERENCE SUR EAUX PROPRES	5
4. LE TEMPS DE VORTEX POUR L'ANALYSE SUR EAUX SALES	8
5. PERSPECTIVES POUR LE SUIVI DES PERFORMANCES DU DENOMBREMENT DE <i>LEGIONELLA</i>	9
6. CONCEPTION ET REALISATION DE LA NOTE TECHNIQUE	9
7. REFERENCES UTILISEES	9

1. EVOLUTION DU NOMBRE DE LABORATOIRES APPLICANT LA VERSION NF T90-431 (2014) SUR EAUX PROPRES

Lors des deux derniers essais sur eaux propres réalisés en 2014, 83% (essai 14M32.2) et 92% (essai 14M32.3) des laboratoires avaient testé le nouveau protocole.

En 2015, l'évolution du nombre de laboratoires ayant mis en œuvre la nouvelle version de la norme est représentée ci-dessous :



L'obligation faite aux laboratoires accrédités COFRAC de se conformer à la nouvelle version de la norme dans les 6 mois suivant sa parution est la raison expliquant l'augmentation du nombre de laboratoires ayant mis en place la NF T90-431 (2014) entre le 1^{er} et le 4^{ème} trimestre 2015.

2. LA REPETABILITE DES ETAPES DE FILTRATION SUR EAUX PROPRES

En remplacement des différentes étapes après concentration, la nouvelle version de la norme propose des étapes de filtration de 10ml et 100ml pour les eaux propres.

La répétabilité observée lors de l'étape de filtration de 10 ml est décrite dans les tableaux ci-après.

Pour rappel : l'intérêt de réaliser des mesures répétées sur chaque échantillon lors des essais interlaboratoires est d'accéder à la répétabilité de chaque laboratoire et à celle observée par le panel de participants.

Cette composante de la fidélité est celle qui relate la mise en œuvre de l'analyse dans les conditions les plus homogènes et sert donc de base pour l'évaluation des performances de la méthode ainsi que pour positionner la variabilité additionnelle observée entre les laboratoires.

Dispersion des mesures répétées en fonction des essais pour l'étape après filtration de 10 ml	14M32.2	14M32.3	15M32.1	15M32.2
	Sept 2014	Déc 2014	Mar 2015	Oct. 2015
Dispersion des mesures répétées idéale (conforme à la loi de Poisson)	85%	87%	<i>Non testé</i>	79%
Sur-dispersion significative des mesures répétées (à 5%)	5%	5%	<i>Non testé</i>	6%
Sur-dispersion très significative des mesures répétées (à 1%)	10%	8%	<i>Non testé</i>	15%

La dispersion des mesures répétées obtenue lors des filtrations de 10 ml est globalement satisfaisante avec, lors du dernier essai, près de 80% des répliques présentant une dispersion idéale, conforme à la loi de Poisson.

Il peut néanmoins être noté que les pourcentages observés pour cette étape sont plus bas que ceux généralement obtenus lors des essais de microbiologie de base sur eaux propres (où environ 95% des données montrent une dispersion des mesures répétées idéale).

Comparativement, le pourcentage observé pour l'étape « après concentration et traitement acide » de la NF T 90-431 (2003) était compris entre 55% et 75% de résultats conformes à la loi de Poisson, selon le niveau respectivement élevé ou bas de charge bactérienne des échantillons.

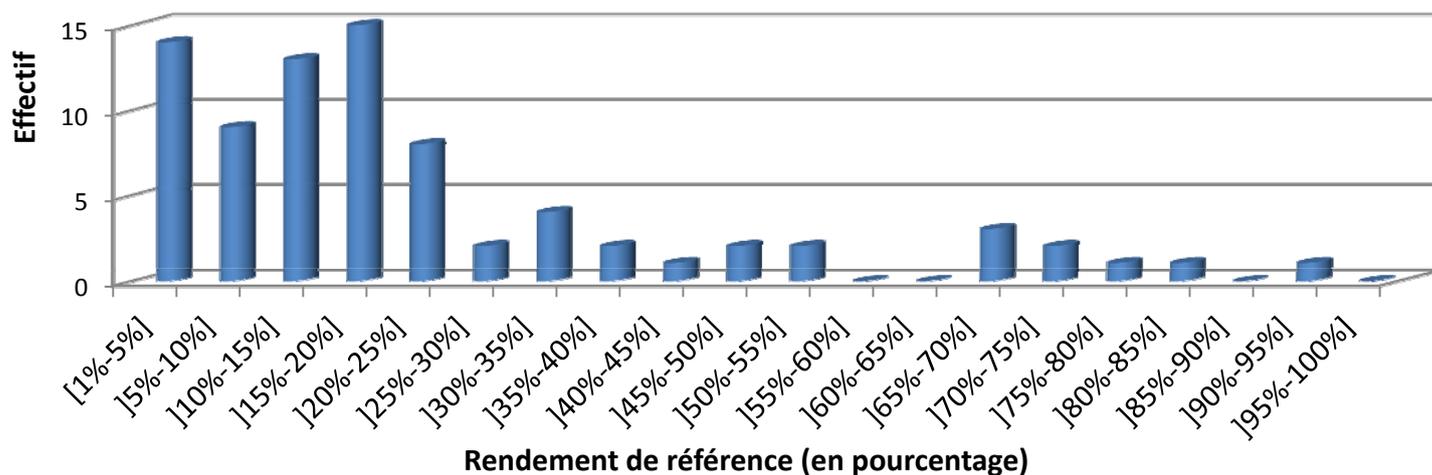
Aux niveaux de concentration plutôt bas testés en 2014 et 2015, la répétabilité de l'étape après filtration de 10 ml est donc sensiblement meilleure que celle observée pour l'étape « après concentration et traitement acide » de l'ancienne version de la norme.

3. LES RENDEMENTS DE REFERENCE SUR EAUX PROPRES

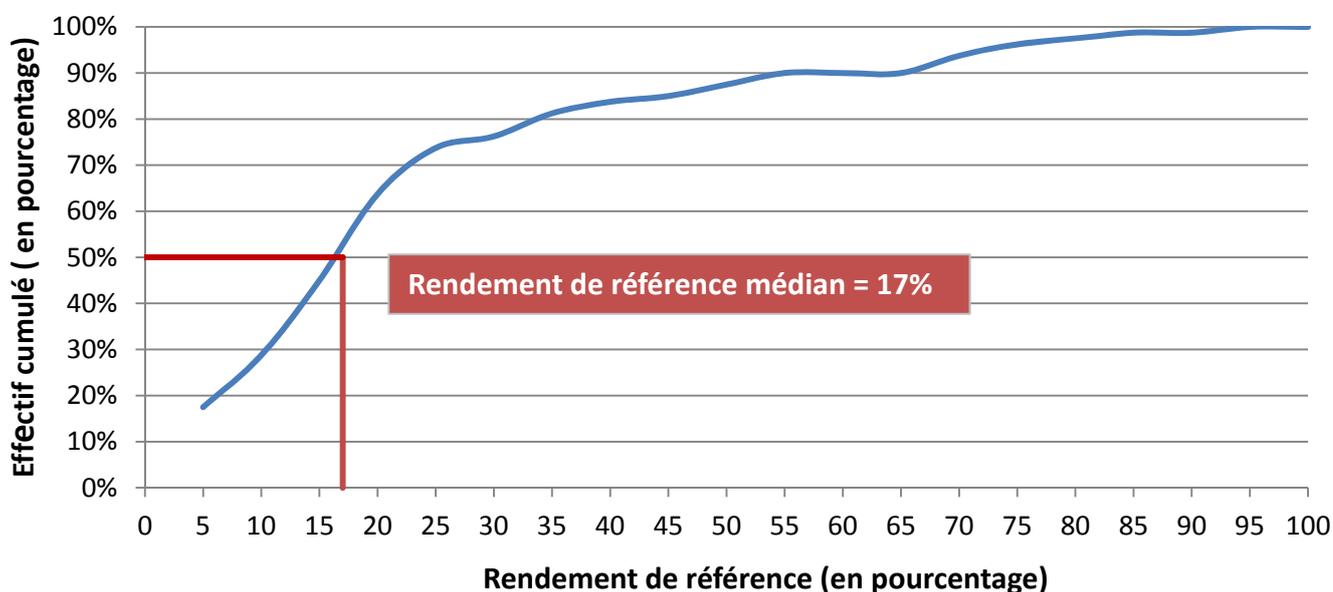
La nouvelle version de la norme NF T90-431 de 2014 impose un contrôle des performances (annexe D) avec notamment un suivi régulier des rendements de l'étape après filtration, en ce qui concerne les eaux propres. Ce suivi est mis en place après avoir établi un rendement de référence au sein de chaque laboratoire.

Lors du 1^{er} essai de 2015 sur eaux propres, les rendements de référence établis en interne et déclarés par 80 laboratoires (soit 51% des participants utilisateurs de la version 2014 de la norme) ont été recueillis et examinés en détail. Une représentation graphique de ces rendements de référence déclarés est présentée ci-dessous :

15M32.1



Une autre représentation en effectif cumulé est proposée ci-dessous :

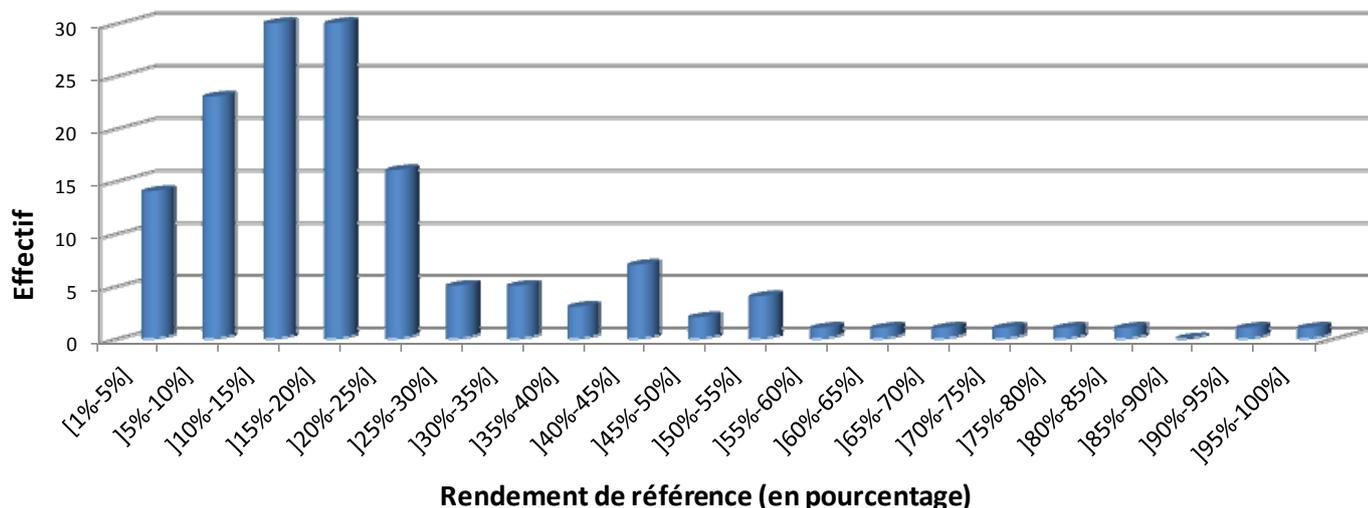


Début 2015, un rendement de référence médian égal à 17% a été observé.

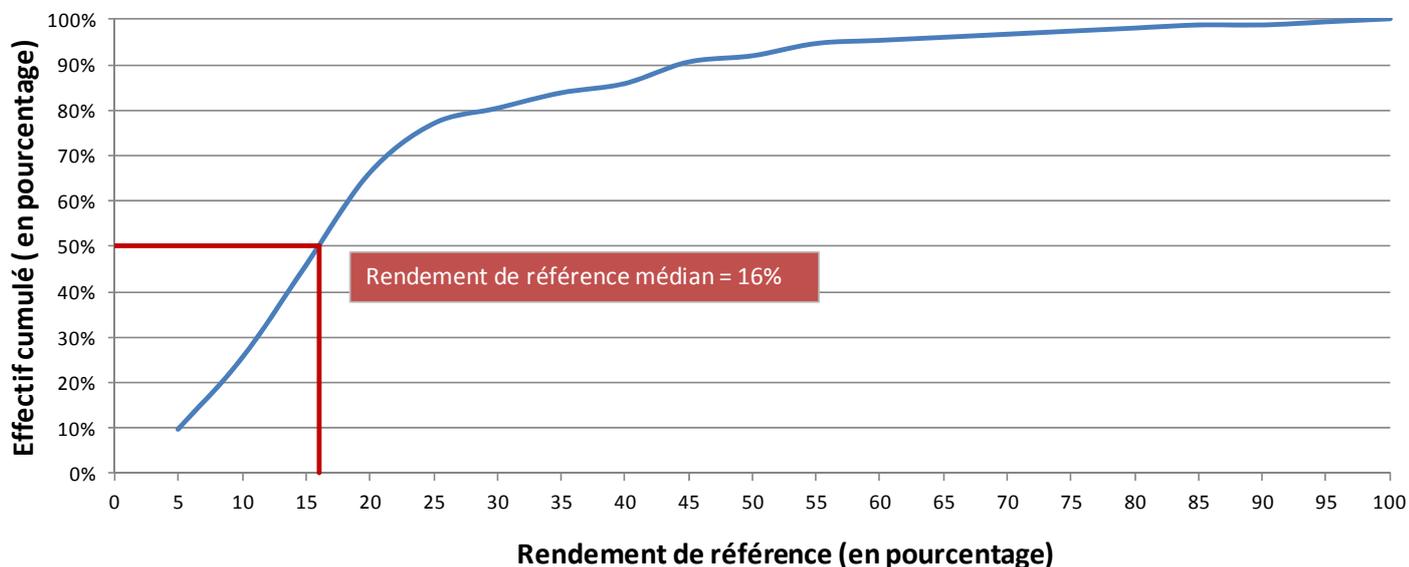
Il peut être remarqué que 74% des laboratoires ont déclaré un rendement de référence compris entre 1 et 25%. L'histogramme révèle la présence de deux modes : l'un pour des rendements entre 1 et 5% et l'autre pour des rendements entre 15 et 20%. Des écarts entre fournisseurs de consommables (membrane) et / ou des différences de préparation des inocula utilisés, nécessaires à la réalisation des rendements, sont susceptibles d'être à l'origine de cette singularité.

Pour le second essai de 2015 sur eaux propres, 147 laboratoires ont renseigné leur rendement de référence (soit 63% des participants utilisateurs de la version 2014 de la norme). La répartition des données est détaillée ci-dessous :

15M32.2



La représentation en effectif cumulé est présentée ci-dessous :



Lors du second semestre 2015, le rendement de référence médian est égal à 16%. Il reste très proche de celui évalué en début 2015. De même, 77% des laboratoires ont déclaré un rendement de référence compris entre 1 et 25%.

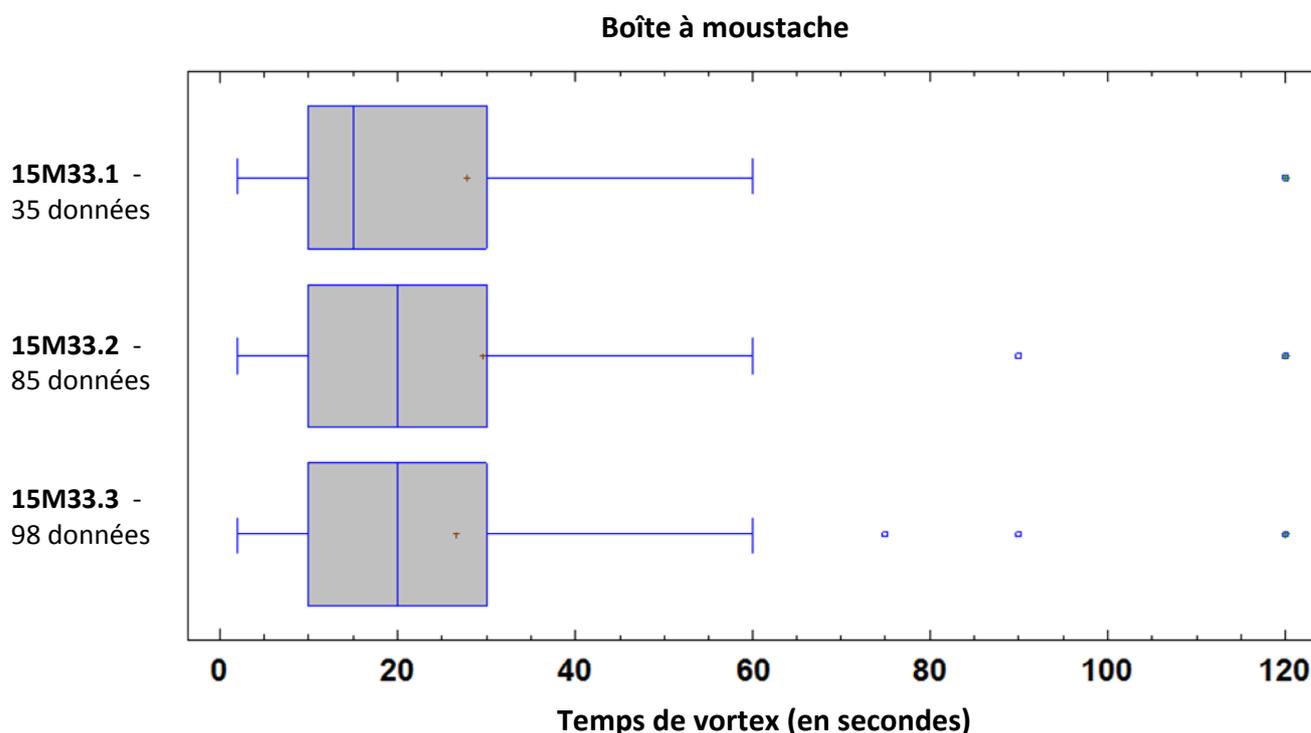
Avec un nombre plus conséquent de rendements déclarés lors du second essai, on note un 'recentrage' des observations les plus fréquentes autour de 10-15% et 15-20%.

De manière globale, il n'a pas été observé de changement significatif du rendement de référence sur eaux propres, au niveau de la profession, au cours de l'année 2015.

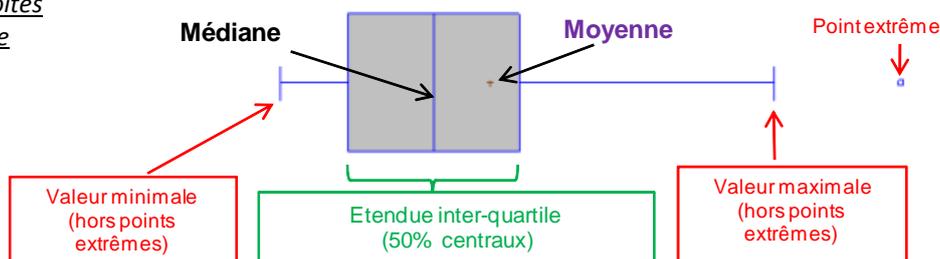
4. LE TEMPS DE VORTEX POUR L'ANALYSE SUR EAUX SALES

Pour l'analyse sur eaux sales, très peu de modifications ont été apportées dans la nouvelle version de la norme. Le changement majeur reste l'utilisation du vortex pour la concentration par filtration et donc la détermination du temps optimal de vortex défini par le laboratoire.

Une représentation des pratiques mises en œuvre par les laboratoires ayant participé aux essais interlaboratoires en 2015 est présentée ci-dessous :



Légende des boîtes à moustache



Le temps de vortex médian était compris entre 15 et 20 secondes lors des essais de 2015. En élargissant l'angle de vue de la tendance centrale, il est constaté que les 50% des laboratoires les plus centraux ont déclaré un temps d'agitation compris entre 10 et 30 secondes.

Note : les données d'essais interlaboratoires en 2015 n'ont pas permis d'établir de corrélation entre les temps de vortex déclarés par les participants et les taux de récupération des Legionella après concentration.



5. PERSPECTIVES POUR LE SUIVI DES PERFORMANCES DU DENOMBREMENT DE *LEGIONELLA*

Cette étude de la nouvelle méthodologie NF T90-431 se poursuit à travers les essais interlaboratoires successifs, mis en œuvre avec des souches et des niveaux de charges bactériennes différents.

Dans les rapports de routine, des informations sont également présentées concernant les effets 'fournisseurs de milieu GVPC' et 'fournisseurs de membrane' qui s'avèrent fréquemment significatifs au niveau statistique et considérables sur le plan quantitatif.

Pour l'établissement des rendements de référence, l'objectif le plus ambitieux au niveau de la profession semble être le choix et l'utilisation de souches au comportement biologique stable dans le temps, afin que les variations mesurées pour le suivi du rendement soient bien celles du protocole analytique et non celles de l'inoculum utilisé. La révision de la NF T90-431 à venir proposera de nouveaux exemples allant dans ce sens.

A moyen terme, la question de l'incertitude de mesure pour le dénombrement de *Legionella* pourra être abordée, en termes de variabilité aléatoire compte-tenu des modalités spécifiques au mode opératoire révisé, mais également en termes d'erreur systématique quand les rendements après filtration / concentration seront sous contrôle dans les laboratoires d'analyse.

6. CONCEPTION ET REALISATION DE LA NOTE TECHNIQUE

La présente note technique a été réalisée par l'équipe d'Exploitation Biologie, en collaboration avec l'équipe Technique et la Direction d'AGLAE.

7. REFERENCES UTILISEES

ISO 11731 : 1998 - Qualité de l'eau - Recherche et dénombrement des *Legionella*

ISO 11731-2 : 2004 - Qualité de l'eau - Recherche et dénombrement des *Legionella* -- Partie 2: Méthode par filtration directe sur membrane pour les eaux à faible teneur en bactéries

NF T90-431 : 2014 - Qualité de l'eau - Recherche et dénombrement de *Legionella* spp et de *Legionella pneumophila* - Méthode par ensemencement direct et après concentration par filtration sur membrane ou centrifugation

NF T90-431/A1 : 2006 (*version abrogée*) - Qualité de l'eau - Recherche et dénombrement de *Legionella* spp et de *Legionella pneumophila* - Méthode par ensemencement direct et après concentration par filtration sur membrane ou centrifugation

NF T90-431 : 2003 (*version abrogée*) - Qualité de l'eau - Recherche et dénombrement de *Legionella* spp et de *Legionella pneumophila* - Méthode par ensemencement direct et après concentration par filtration sur membrane ou centrifugation