

Analyse des réseaux d'eau

> NOTE D'APPLICATION N°1

Utilisation des kits Quench-Gone Aqueous™ comme outil d'aide à la mise en place de l'Analyse Méthodique des Risques et de Plans de Surveillance des Réseaux Sanitaires et des tours aéroréfrigérantes, dans le milieu hospitalier, et industriel.



Analyse des réseaux d'eau -> NOTE D'APPLICATION N°1

INTRODUCTION

es risques sanitaires imposent la mesure de la contamination bactérienne sur les différents réseaux d'eau de l'hôpital. L'utilisation des Kits Quench-Gone Aqueous™, mesure de la biomasse présente dans l'écosystème des réseaux d'eau, est un test rapide, robuste et suffisamment précis, pour vous aider à détecter, rapidement en cinq minutes, les zones ou les points à risque des installations, vous permettant ainsi une action de traitement corrective.

Ce nouvel outil de mesure de la biomasse active par bioluminescence nous permet de suivre et contrôler rapidement, en temps réel, la détermination de la dose efficace et suivre l'efficacité du traitement dans une installation d'une part et de réussir, d'autre part, une désinfection d'un réseau d'eau.

Les kits Quench-Gone Aqueous™, utilisent une nouvelle génération de test, pour la mesure de l'ATP (Adénosine Triphosphate) intracellulaire, permettant ainsi une quantification de la biomasse (en pg/ml).

Qu'est ce que l'ATP?

L'Adénosine Triphosphate (ATP) est la première source d'énergie de tout organisme vivant sur terre. L'ATP constitue le « carburant » de toute cellule vivante en fournissant l'énergie nécessaire à toutes les fonctions biologiques telles que l'entretien de la cellule et son adaptation aux changements environnementaux, la consommation de nourriture ou la fonction de reproduction.

Comme tous les organismes vivants sur Terre, les microorganismes ont besoin d'ATP pour survivre, et sans cette molécule il n'y aurait aucune vie possible. Ainsi, l'ATP est une molécule indispensable à la vie microbienne et sa mesure est directement liée à la biomasse.

La mesure d'ATP:

Le principe de la mesure de l'ATP repose sur le comptage de photons produit par l'action d'une enzyme, la luciférase, qui émet des photons en hydrolysant les molécules d'ATP. C'est la bioluminescence.

Plusieurs types de mesure sont réalisables: la mesure de l'ATP total d'un échantillon ou la mesure de l'ATP extracellulaire ou encore la mesure de l'ATP intracellulaire. Ces trois grandeurs sont reliées par l'équation ATP total = ATP intracellulaire + ATP extra-cellulaire.

Le paramètre le plus pertinent pour l'évaluation de la qualité microbiologique d'une eau est l'ATP intracellulaire. Il est possible d'accéder à cette valeur en filtrant l'échantillon et en procédant à une lyse des bactéries retenues sur le filtre pour libérer leur ATP.

FOCUS

→ POURQUOI L'ATP EST-IL IMPORTANT?

Pour fonctionner, une cellule biologique a besoin de transformer ses nutriments (par exemple des molécules contenant des chaînes carbonées) en une forme d'énergie utilisable, l'ATP. L'énergie nécessaire aux différentes réactions chimiques qui se produisent dans la cellule est en fait libérée lorsque l'ATP est réduit en molécules plus petites et moins riches en énergie, telles que l'ADP (Adénosine Diphosphate) et l'AMP (Adénosine Monophosphate). Ces molécules sont ensuite recyclées en ATP avec l'apport de nouveaux nutriments. Ce processus est la voie métabolique centrale de toute cellule et s'applique à tous les organismes vivants, y compris les bactéries.





Analyse des réseaux d'eau → NOTE D'APPLICATION N°1

Comment mesure-t-on l'ATP?

L'énergie contenue dans l'ATP est convertie en lumière en présence de Luciférine et de Luciférase. Ces deux molécules sont produites naturellement dans l'abdomen de la Luciole. L'exploitation de ce phénomène naturel fournit un indicateur instantané du taux de micro-organismes dans n'importe quel type d'eau.

La mesure de l'ATP prend seulement quelques minutes pour être réalisée, du prélèvement de l'échantillon jusqu'à l'analyse.

L'ATP est extraite à partir des cellules vivantes, et préparée pour la mesure selon le protocole simplifié ci-dessus. L'extrait est dilué dans le but de minimiser les effets des inhibiteurs présents dans l'échantillon.

L'intensité lumineuse est mesurée grâce à un luminomètre. La quantité de lumière produite est directement proportionnelle à la biomasse active présente dans l'échantillon. Cette réaction est linéaire et tient compte d'un grand nombre de micro-organismes.

Surveillance des installations grâce à l'ATP-métrie

Les kits Quench GoneTM Aqueous et Quench GoneTM organic sont développés par **LuminUltra**TM et commercialisés par **Taireo**. Ils sont conçus spécifiquement pour la mesure de la biomasse active dans les **eaux potables**, les **eaux chaudes sanitaires**, les **eaux des tours** aéroréfrigérantes, les **eaux de process** de l'industrie. Les kits sont optimisés pour chaque type d'eau et pour chaque niveau de contamination. Ils peuvent être adaptés pour chaque point d'un circuit.

La technique de mesure de la biomasse active est simple d'utilisation et fournit un résultat instantané. La mesure est précise grâce à un luminomètre portable et performant. La mesure de la biomasse active est un outil de surveillance en continue de l'évolution de l'état microbiologique de l'installation.

UTILITÉ

La surveillance de la biomasse active permet de...

→ réaliser l'analyse de risque et de la contrôler

L'ATP est spécifique des organismes vivants, le suivi de la mesure de l'ATP peut jouer un rôle critique dans l'analyse de risque d'une installation, il peut assurer la qualité du produit industriel.

→ diminuer les coûts de charge d'une installation

Le suivi de la biomasse active permet d'optimiser la rentabilité, du coût des biocides injectés jusqu'au traitement des eaux de rejet.

→ avoir l'esprit serein

Le résultat instantané permet une réactivité inestimable : détecter la contamination au moment où elle se produit, avant qu'il ne soit trop tard. Cette réactivité permet également de répéter les résultats incohérents, aucune autre mesure biologique ne permet cela.

→ réduire les impacts sur l'environnement

Détecter la biomasse résiduaire qui s'échappe des effluents des usines, et optimiser l'utilisation des biocides.







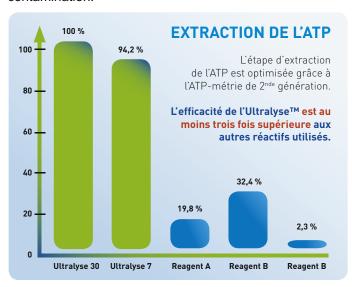
PRÉCISION DE MESURE

Précision supérieure à celle de l'ATP-métrie de 1e génération.

- 1. La précision de la mesure commence par la qualité de l'échantillon et la manière dont il est intégré dans l'analyse.
- Le volume d'analyse est assez grand pour fournir une indication représentative du niveau de contamination,
- Un prétraitement par Itration (Itre/seringue) simple est réalisé sur le terrain. Cela permet de concentrer la biomasse, d'éliminer l'ATP extra-cellulaire provenant de micro-organismes morts, et de minimiser l'effet des inhibiteurs sur la mesure. Par la suite, l'échantillon peut être conservé plusieurs jours à 4°C,hors conservation la mesure doit être faite dans les 2 heures.
- Adapter le volume pour maximiser la sensibilité de la mesure, permettant de réaliser les analyses sur tous les types d'eaux.

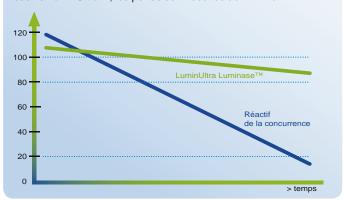
2. Par comparaison, l'ATP-métrie de première génération utilise un « stylo » :

le résultat est identi é de manière triviale sur le principe du *tout ou rien*, c'est-à-dire l'échantillon est « contaminé » ou « n'est pas contaminé » et son application trouve son intérêt dans l'hygiène alimentaire ou pharmaceutique. La technique élémentaire ne mesure que les bactéries libres et en suspension sur un volume d'échantillon de l'ordre de quelques microlitres, peu représentatif de l'état de contamination.



STABILITÉ DE LA LUMINASE

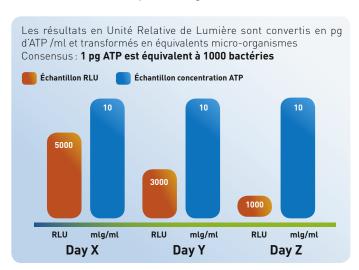
Une meilleure stabilité: la luciférine est l'enzyme qui réagit avec l'ATP pour émettre la lumière qui sera mesurée par le luminomètre. Les réactifs LuminUltra™ sont stables pendant des mois lorsque les réactifs de la concurrence ont une durée de vie de quelques jours. Avec les réactifs LuminUltra™, les pertes sont réduites au minimum.



3. Une mesure exacte

La plupart des fournisseurs mesurent en Unité Relative de Lumière (RLU). Cette valeur dépend du rendement arbitraire du luminomètre, de l'activité de la luminase et ne garantit pas l'exactitude de la mesure de l'ATP.

Pour réduire cette dépendance et pour maximiser l'exactitude de la mesure, LuminUltra™ a développé la ligne d'Ultra Check™. L'UltraCheck™ est un ajout dosé d'ATP, stable dans le temps pendant des mois même à température ambiante. Ceci assure de pouvoir comparer avec con ance les résultats dans le temps en concentration d'ATP au lieu des RLU utilisés dans l'ATP-métrie de première génération.



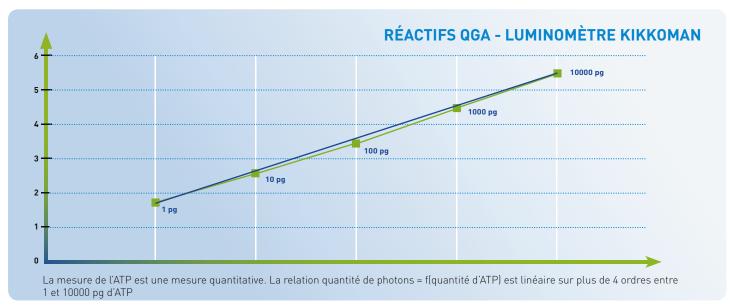


Analyse des réseaux d'eau > NOTE D'APPLICATION N°1

ÉTUDE DE LA RÉPÉTABILITÉ DES KITS QUENCH GONE AQUEOUS ™

Quantité		Répétitions de la mesure : valeurs en RLU						
d'ATP en nanogramme	Tube 1	Tube 2	Tube 3	Tube 4	Tube 5	Moyenne	Écart type	Coefficient de variation en %
Blanc	42	49	47	50	47	47	3,082207	6,6
0,001	65	76	69	74	75	71,8	4,65832588	6,5
0,01	482	384	435	438	394	426,6	39,2020408	9,2
0,1	3559	3608	3091	2978	3341	3315,4	278,300737	8,4
1	32978	27023	35367	31812	32916	32019,2	3079,62087	9,6
10	295940	327283	283946	317055	305068	305858,4	17055,2778	5,6

Étude réalisée par GL biocontrol, Laurent Garrely



La limite de quantification en mesure directe sans tenir compte de la concentration est de 1pg d'ATP avec une reproductibilité représentée par un coefficient de variation de 7 %.

Sur des eaux très propres comme des eaux froides sanitaires, grâce à l'étape de concentration sur filtre, il est possible de mesurer l'ATP contenu dans un à cinq millilitres d'eau ce qui permet d'obtenir une limite de quantification de l'ordre de 0,2 pg par ml soit l'équivalent de 200 bactéries par ml.

À l'inverse, pour des eaux de circuit de refroidissement il est possible de mesurer directement jusqu'à 100 ng d'ATP par ml.

Ce domaine de mesure est également et parfaitement adapté à l'analyse des eaux tout au long du process de refroidissement dans les tours aéroréfrigérantes. La mesure par bioluminescence est une mesure d'activité enzymatique réalisée par un compteur de photons. Il est indispensable de calibrer le système de mesure (enzyme et compteur) avant toute série de mesure. Ceci est réalisé grâce à un étalon d'ATP correspondant à 10 ng. (UltraCheck) Les mesures effectuées sont ensuite rapportées à la valeur de l'étalon.

Pour chaque luminomètre une valeur limite basse et une valeur limite haute permettent de vérifier l'état du système de mesure et d'accepter la calibration.





UTILISATION

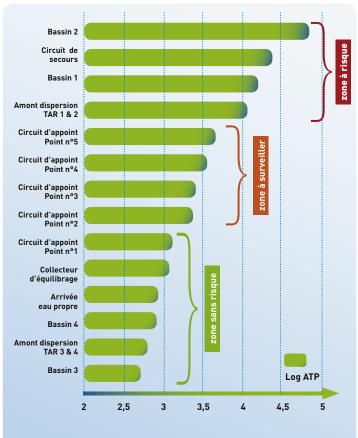
Comment utiliser l'outil ATP sur une installation à risque?

1. Pour définir des points de surveillance en utilisant l'Analyse Méthodique Risque

Si on considère un réseau d'eau, en suivant la démarche d'analyse méthodique des risques, il est possible de déterminer une dizaine de points critiques selon la complexité du réseau.

Une mesure de biomasse (ATP intracellulaire) planctonique sur chaque point critique permet de caractériser le niveau de risque du point.

Exemple : Mesure de la Biomasse (ATP intracellulaire) dans un réseau d'eau de Tour aéroréfrigérante



Cartographie de la Biomasse : 14 points d'échantillonnage ont été prélevés sur un circuit de refroidissement : les résultats de la mesure de biomasse permettent de classer les points, d'analyser la production de biomasse secteur par secteur dans le circuit et de définir des zones à différents degrés de risque.

2. Pour suivre les points critiques et déclencher des prélèvements pour analyse spécifique

Les points critiques majeurs peuvent être suivis à cadence élevée, car la mesure n'est pas très coûteuse et les dérives (élévation de la biomasse) supérieures à 0,3 log – soit une croissance de 100 % – peuvent être considérées comme significatives et doivent être expliquées ou du moins surveillées.

3. Pour suivre à cadence élevée une action préventive ou une action curative

Les actions de maîtrise décidées par le comité de pilotage de l'Analyse Méthodique des Risques visent à réduire le risque pour l'installation. Ces actions peuvent le plus souvent être suivies par des mesures d'ATP.

Par exemple : une action de nettoyage chimique visant à réduire la biomasse fixée sur les surfaces de l'installation va avoir pour conséquence de faire diminuer la biomasse fixée et de faire augmenter la biomasse planctonique. La cinétique de ces deux phénomènes doit être surveillée pour décider de l'arrêt de l'action, de la purge du circuit, ou de l'injection de biocide pour neutraliser les bactéries décrochées. La mesure de l'ATP est parfaitement adaptée à cet objectif.

4. Pour surveiller une installation équilibrée et stabilisée

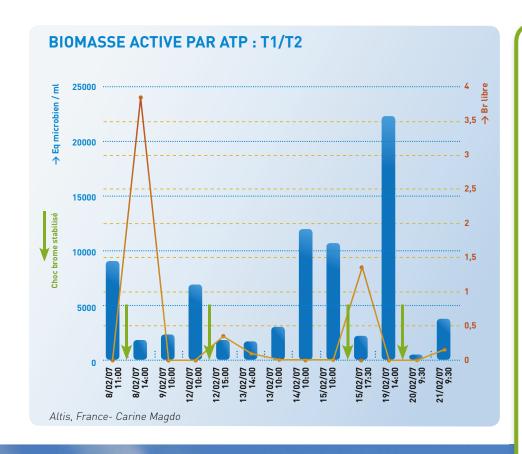
La réglementation impose une analyse spécifique selon la norme NF T 90- 471 tous les mois sur les installations de TAR. Les dérives de l'écosystème sont quelquefois très rapides et la situation est d'autant plus délicate à rétablir que la dérive est importante. Il est donc très avantageux de pouvoir détecter précocement tout début de dérive. La mesure quasi quotidienne de l'ATP est parfaitement indiquée.

5. Pour la réalisaton d'audit sur les réseaux d'eau

Utilisation de l'ATP métrie pour définir des points de surveillance en utilisant l'Analyse Méthodique Risque et les mesures compensatoires.



Analyse des réseaux d'eau → NOTE D'APPLICATION N°1

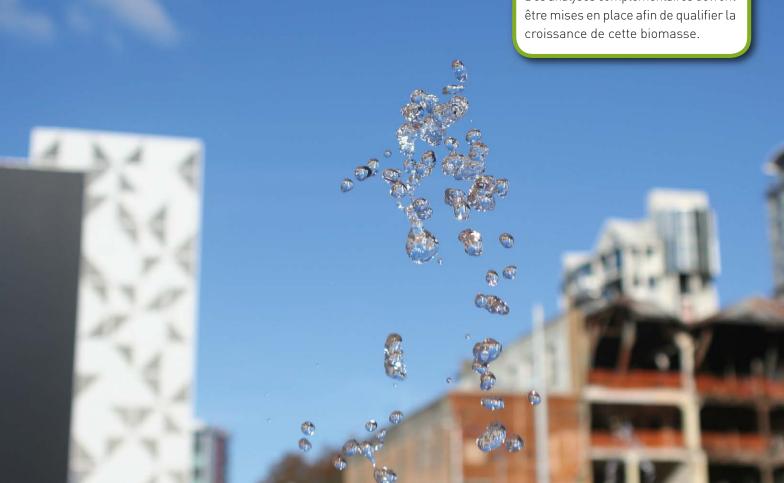


CONCLUSIONS

La mesure de l'ATP est l'indicateur très pertinent de suivi opérationnel, pour la mesure des micro-organismes actifs pour tous les réseaux d'eau.

Des eaux naturelles, aux eaux potables, ainsi que pour les eaux de process, l'ATP constitue la première ligne de surveillance et de contrôle dans une stratégie de d'analyse et de maîtrise du risque microbiologique (selon AMDEC, HACCP ou autre méthode).

Les mesures de la biomasse active par ATP-métrie permettent de mettre en place des programmes de surveillance journaliers des installations d'eau. Ces mesures d'alertes précoces, aideront les opérateurs à surveiller les zones à risque dans leur installation et d'être pro actifs dès que les résultats de la mesure de la biomasse évolueront. Des analyses complémentaires devront être mises en place afin de qualifier la croissance de cette biomasse.





ÉTUDE DE CAS #1

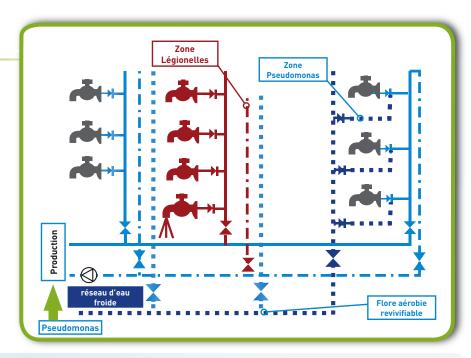
Établissement hospitalier

Jacques NAITYCHIA (Assistance Publique Hôpitaux de Paris)

Problématique:

Depuis plusieurs mois, cet établissement constate une contamination persistante au niveau du réseau d'eau froide alimentant la pièce des endoscopes. Les analyses bactériologiques à divers points du réseau tentent à confirmer que « l'ensemble du réseau développe une flore aérobie en dehors des seuils autorisés ».

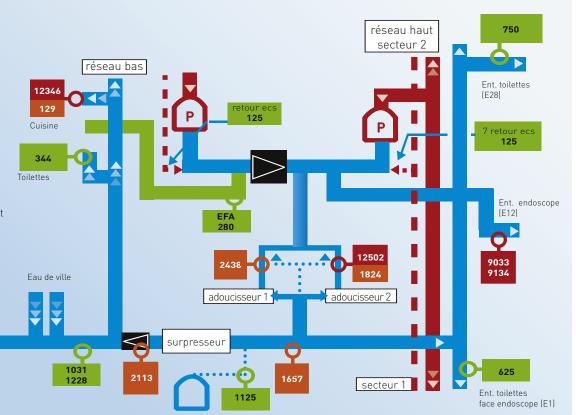
La question est donc posée : faut-il réaliser une désinfection globale du réseau ? Cela semble difficile compte tenu de l'occupation des locaux, du type de patients et de la faisabilité technique de l'opération sans parler du coût.



LOCALISATION DES CONTAMINATIONS DU RÉSEAU D'EAU FROIDE

Les résultats sont exprimés en équivalents microorganismes par ml.
Les valeurs présentées en vert correspondent à des niveaux de biomasse correcte, celles en orange sont à surveiller et celles en rouge correspondent à des valeurs nécessitant une action curative immédiate. Première série de mesures repère A, la deuxième B.

Validation immédiate du traitement de l'adoucisseur 2, (valeur avant traitement 12502 équivalent micro-organismes, après traitement 1824 équivalent micro-organismes), et du choc thermique localisé au point de prélèvement cuisine. (valeur avant traitement >12502 équivalent micro-organismes, après traitement 129 équivalent micro-organismes),





Analyse des réseaux d'eau → NOTE D'APPLICATION N°1

Après avoir réalisé un schéma de principe rigoureux du réseau de distribution d'eau froide (et chaude), un plan d'échantillonnage est mis en place dans l'ordre suivant : arrivées d'EF, équipements en sous-station (régulateurs de pression, adoucisseurs...), canalisations d'alimentation principales alimentant les deux réseaux (1 et 2) et enfin canalisations alimentant les endoscopes.

La première série d'analyses par l'ATP métrie, réalisée en une matinée, met en évidence que l'adoucisseur n° 2 développe une biomasse importante, ce qui semble être responsable de la contamination du réseau adouci qui alimente les endoscopes. Cette canalisation est raccordée directement derrière cet adoucisseur. L'ensemble du réseau a des résultats qualifiés de « bon ».

Le point de référence en cuisine est « mauvais ». Une deuxième série d'analyses met en évidence que la contamination de la cuisine est uniquement terminale. Après la désinfection de l'adoucisseur le résultat redevient à un seuil acceptable. La canalisation des endoscopes a développé un biofilm résistant à une décontamination chimique. Un adoucisseur doit être installé dans la pièce des endoscopes pour s'affranchir du réseau.

Les deux analyses sur le retour des bouclages d'eau chaude sanitaire mettent en évidence que l'action de désinfection (par la méthode de la circulation à contre-courant d'une eau chlorée à 60 °C) dans le cadre de la lutte contre les légionelle est efficace. Il faut savoir que la couleur de l'eau issue des bouclages stagnants, à l'origine de la contamination, était couleur café!

BILAN

En deux séries de mesures, cette méthode a permis de réorienter les décisions, de mettre en œuvre les mesures correctives sans délai et d'en mesurer les résultats immédiatement.

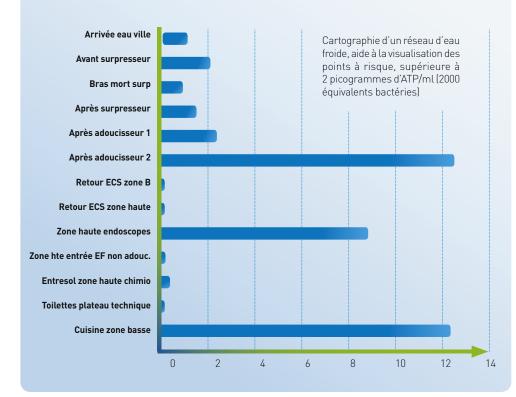
À l'issue de cette démarche, les analyses bactériologiques seront réalisées.

Le suivi de l'évolution de la biomasse est un moyen de prévention et un outil efficace pour la maintenance des réseaux.

« Il vaut mieux prévenir que guérir »

Jacques Naitychia

ANALYSE PAR ATP-MÉTRIE PAR DATE: 15 MARS 2007



Volumes d'analyse recommandés:

Basée sur de multiples évaluations, LuminUltra recommande les volumes d'analyses suivants pour le QGA, dépendant de la nature de l'eau et des biocides utilisés:

Source	Vol. d'analyse recommandé
Eau potable	50 – 100 ml
Eau de TAR	10 – 50 ml
Eau recyclée	5 – 25 ml
Eau de surface	5 – 25 ml
Eau ultra-pure	100+ ml

Les volumes peuvent être ajustés pour optimiser la sensibilité.

Recommandations:

Le QGA est utilisé pour piloter en temps réel les installations et optimiser les programmes de contrôle microbiologique des eaux peu chargées de matière en suspension. Ce tableau a une valeur informative pour aider l'exploitant car chaque installation est différente.

Procédé	Param.	Bonne qualité	Action préventive	Action corrective
Eau potable				
Eau TAR (biocides non-oxydant)				
Eau TAR (biocides oxydant)*				
Eau de surface ou recyclée				

^{*} Inclut le chlore, le brome, le péroxyde, etc.



ÉTUDE DE CAS #2

Centre Hospitalier de Versailles Docteur Pierre ALLOUCH

(Étude effectuée au mois de décembre 2006, par Nelly Breton, technicienne Hygiéniste)

Types d'eau analysée:

Eau pour soins standards : 49 sites Eau à usage alimentaire : 12 sites

Eau bactériologiquement maîtrisée : 27 sites

Eau adoucie pour dialyseur : 27 sites Eau de tours aéroréfrigérantes : 3 sites

Méthode de référence :

Filtration sur membrane en ester de cellulose

Recherche de la flore aérobie revivifiable, *Pseudomonas aeruginosa* et coliformes: culture sur milieu gélosé (TCS, sélectif pour coliformes, cétrimide)

Délai de 24 à 72 h

Méthode classique:

Alerte-action si 1 pathogène et/ou numération >100 UFC

Connaissance antérieure des réseaux à l'aide des méthodes de référence

Eau	Absence d'alerte	Alerte pour la présence pathogène	Alerte pour flore aérobie revivifiable
pour soins standards	100	5	3
alimentaire	50	0	1
bact maîtrisée	150	2	6
adoucie pour dialyse	6	3	12
tour aéroréfrigérante	5	0	13
Total	311	10	35

Résultats avec le kit QGA™:

Eau	< 1pg ATP/mL	> 1pg ATP/mL
pour soins standards	32	16
alimentaire	12	1
bact maîtrisée	27	0
adoucie pour dialyse	0	9
tour aéroréfrigérante	1	2
Total	72	28

QGA TM:

Alerte-action sur la concentration en pg ATP/ml de la biomasse (recommandation fournisseur) Méthode classique, 12 % des réseaux contaminés versus 28 % QGA $^{\text{TM}}$

DÉLAI POUR L'OBTENTION	ATP-métrie	Culture bactériologique			
DES RÉSULTATS	Eaux réseaux	Eau soins standards	Eau usage alimentaire	Eau bact. maîtrisée	
Déplacement & prélèvement	5 min	5 min	5 min	5 min	
Saisie informatique	1 min	1 min	1 min	1 min	
Préparation matériel maintenance		5 à 10 min			
Filtration - ensemencement	2 min	3 min	3 min	2 min	
Lecture & interprétation					
Si résultat négatif	< 1 min	< 1 min			
Si résultat positif	< i min	5 à 10 min			
Délai de rendu du résultat	Temps réel	J+3			

CONCLUSION

du docteur Allouch (C.H Versailles) :

- Méthode sensible de détermination de la biomasse
- Facile à mettre en œuvre
- Rapide
- Moins coûteuse que les cultures bactériologiques
- Adaptée au screening donc à la prévention



Kits QG™ (Quench Gone)

Principe: les kits QG™ basés sur une étape de filtration sont destinés aux eaux peu chargées de matières en suspension. L'étape de filtration permet de concentrer la biomasse vivante, d'éliminer la totalité de l'ATP extra-cellulaire et 90 à 95 % des inhibiteurs présents dans



l'échantillon. L'UltraLyse™ permet de lyser les bactéries retenues sur le filtre et d'extraire l'ATP intracellulaire (cATP™). Ce paramètre est le plus pertinent pour l'évaluation de la qualité microbiologique d'une eau. Le rendement d'extraction est proche de 100 % et plus de 3 fois supérieur aux autres agents de lyse couramment utilisés.

Les kits QG™ mesurent la biomasse active dans tous les types d'eau par une simple analyse. Le QG™ mesure la concentration en ATP intracellulaire (cATP™) et permet d'en déduire le nombre relatif de micro-organismes par mL.

QGA™ (Quench-Gone™ Aqueous)

Présentation: Les tests QGA[™] sont optimisés pour détecter des équivalents microbiens compris entre 500 et 667.000.000 par mL (0,5 à 6,7x10⁵ pg ATP/ml). Le volume d'échantillon analysé peut être adapté pour amplifier la sensibilité, ce qui permet une limite de quantification de l'ordre de 0,2 pg/mL soit environ 200 bactéries par mL nécessaires pour les eaux dites « propres ».

Stratégie d'utilisation: pour réaliser un plan d'échantillonnage afin de détecter les points critiques, pour le suivi des points critiques et pour surveiller une installation équilibrée.

■ TYPES D'EAUX: eau de surface, nappe phréatique, eau potable, eau ultra-pure, eau de systèmes de refroidissement, eau d'incendie, fabrication du papier, désinfection de l'eau, eaux usées, etc.



(Ref. catalogue	Analyse jusque	Contenu
	QGA-100	100 échantillons	12,5 mL Luminase™ (Réactif de test) 2,5 mL UltraCheck™ 1 (Standard ATP) 125 mL UltraLyse™ 7 (Agent d'extraction) 1000 mL UltraLute™ (Tampon de dilution tATP™)
	QGprep	100 échantillons	100 seringues de 60 mL avec embout Luer-Lock et 100 filtres QG™ pour seringues, 25 mm

QGO™ (Quench-Gone™ Organic)

Présentation: Les tests QGO[™] sont optimisés pour détecter des équivalents microbiens compris entre 500 et 67.000.000 par mL (0,5 à 6,7x10⁴ pg ATP/mL). Le QGO[™] est destiné aux eaux concentrées en matières organiques ou chargées en hydrocarbures.

■ **TYPES D'EAUX:** eau de métallurgie, eau de fabrication de pâte à papier, eau de recyclage dans la fabrication de pâte et de papier, eaux issues des raffineries, eaux usées, etc.

Ref. catalogue	Analyse jusque	Contenu
QG0-100	100 échantillons	12,5 mL Luminase™ (Réactif de test) 2,5 mL UltraCheck™ 1 (Standard ATP) 500 mL LumiClean™ (Agent d'extraction) 100 mL UltraBuff™ (Tampon général de dilution)
QGprep	100 échantillons	100 seringues de 60 mL avec embout Luer-Lock et 100 filtres QG™ pour seringues, 25 mm

