

Le directeur général

Maisons-Alfort, le 19 juin 2020

**NOTE**  
**d'appui scientifique et technique**  
**de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation,**  
**de l'environnement et du travail**

relative à

**deux projets de protocoles de suivi d'abattement des phages dans les boues**  
**et**  
**l'actualisation des connaissances concernant, la présence de SARS-CoV-2 dans les eaux**  
**usées/boues, l'efficacité des procédés d'hygiénisation des boues en ce qui concerne**  
**l'abattement du SARS -CoV-2, les procédés qui pourraient conduire à un abattement des**  
**teneurs en SARS-CoV-2 pour les boues non hygiénisées et l'infectiosité du SARS-CoV-2 dans**  
**différentes matrices**

L'Anses a été saisie le 14 mai 2020 par l'association Robin des Bois (2020-SA-0069). Dans le cadre de cette demande, l'Anses actualisera les connaissances concernant la présence de SARS-CoV-2 dans les eaux usées/boues, si nécessaire, complétera les connaissances relatives à l'efficacité des procédés d'hygiénisation des boues en ce qui concerne l'abattement du SARS-CoV-2, documentera, pour les boues non hygiénisées, les procédés qui pourraient conduire à un abattement des teneurs en SARS-CoV-2, précisera les modalités de protection des travailleurs et actualisera les connaissances concernant l'infectiosité du SARS-CoV-2 dans différentes matrices.

L'Anses a par ailleurs été saisie en urgence le 19 mai 2020 par le Ministère de la transition écologique et solidaire (Direction de l'aménagement du logement et de la nature) pour la réalisation de l'expertise suivante : « Demande d'appui scientifique et technique concernant 2 projets de protocoles de suivi d'abattement des phages dans les boues » (2020-SA-0068).

Considérant les liens entre ces questions, une note d'appui scientifique et technique (AST) commune est rédigée en réponse à ces deux saisines.

La présente note d'AST fait état des connaissances disponibles au 3 juin 2020.

## **1. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE**

Au cours des mois de mars et avril 2020, l'Anses a été saisie en urgence, en lien avec la possible présence du virus SARS-CoV-2 (agent de la maladie COVID-19) dans les eaux usées (EU), pour réaliser des appuis scientifiques et techniques portant d'une part, sur les risques éventuels liés à l'épandage de boues d'épuration urbaines (Anses 2020 et Anses 2020a) et, d'autre part, sur les risques éventuels liés à l'épandage de boues d'épuration industrielles (Anses 2020b).

Le 23 avril 2020, l'Anses s'est autosaisie pour réaliser l'état des connaissances scientifiques relatives au virus SARS-CoV-2, dans les domaines de compétences de la Direction de l'évaluation des risques (Anses 2020c). Dans ce cadre, une note présente l'état de connaissances disponibles au 21 avril 2020 sur la présence, l'infectiosité et la persistance du virus SARS-CoV-2 dans le milieu aquatique (eaux usées, eaux de surface, eaux souterraines, eaux saumâtres, eaux de mer), en lien avec l'excrétion fécale humaine.

Suite à l'avis du 27 mars 2020 (Anses 2020a), un arrêté interministériel précisant les modalités d'épandage des boues issues du traitement des eaux usées urbaines pendant la période de COVID-19 a été pris le 30 avril 2020.

Cependant, selon le texte de la saisine 2020-SA-0068, l'hygiénisation des boues n'est pas une pratique systématique, au sein des collectivités. Sa mise en œuvre par ces collectivités demande une certaine organisation et induit un coût difficilement supportable s'il n'est pas anticipé.

Dans ce contexte, deux protocoles ont été élaborés par l'Université de Lorraine, le Laboratoire national de métrologie et d'essais (LNE), la Fédération nationale des collectivités concédantes et régies (FNCCR) et la Fédération professionnelle des entreprises de l'eau (FP2PE) afin, selon les auteurs des protocoles, que les exploitants et collectivités puissent suivre indirectement le taux d'abattement du SARS-CoV-2 dans les stations de traitement des eaux usées (STEU) ne pratiquant pas l'hygiénisation.

Il est proposé d'utiliser comme indicateurs de la dynamique du SARS-CoV-2, les bactériophages ARN F-spécifiques et les coliphages somatiques. Ces deux types de phages ont été proposés car ils présentent, d'une part des durées de « survie » reconnues supérieures (Anses 2020a) à celles des virus enveloppés communs et donc, *a priori*, sont plus résistants que le SARS-CoV-2 et, d'autre part, chacun présente des profils spécifiques de résistance au pH et à la température. Les auteurs du protocole précisent que « ... *cette étude ne permettra pas d'estimer le titre viral SARS-CoV-2 dans les boues avant et après processus de stockage qui impliquerait des approches PCR complexes à mettre en œuvre et qui en plus ne permettrait pas de suivre le caractère infectieux du virus* »

Le premier protocole consiste en une étude en laboratoire de la cinétique d'abattement des bactériophages et coliphages en fonction du temps et de la température dans un échantillon de boues liquides issues d'une STEU modèle, la STEU de la ville de Reims. Le second protocole consiste à étudier l'abattement moyen des bactériophages au cours de différents processus de stockage des boues *in situ*.

Dans ce contexte, il est demandé à l'Anses :

- de réaliser une analyse critique des protocoles proposés, la finalité étant que les données de suivi issues de la mise en œuvre du protocole par les exploitants et collectivités puissent constituer un dossier technique robuste en vue de l'examen d'éventuelles demandes de dérogation à l'hygiénisation des boues avant épandage.

Par ailleurs, suite à une demande transmise par l'association Robin des Bois (Annexe 2) consécutive à la publication des avis relatifs à l'épandage des boues (Anses 2020a et Anses2020b), l'Anses :

- actualisera les connaissances concernant la présence de SARS-CoV-2 dans les eaux usées/boues, si nécessaire, au regard de l'existence de publications disponibles depuis les derniers avis ou appuis scientifiques et techniques produits par l'Agence ;
- complétera les connaissances relatives à l'efficacité des procédés d'hygiénisation des boues en ce qui concerne l'abattement du SARS-CoV-2 ;
- documentera, pour les boues non hygiénisées, les procédés qui pourraient conduire à un abattement des teneurs en SARS-CoV-2, notamment la durée de stockage et la température et, le cas échéant, précisera les connaissances à acquérir et les modalités de protection des travailleurs ;
- actualisera les connaissances concernant l'infectiosité du SARS-CoV-2 dans différentes matrices.

Cette note complète les avis ou notes de l'Anses précédemment émises (Anses 2020, Anses 2020a, 2020b et 2020c).

## **2. ORGANISATION DE L'EXPERTISE**

L'expertise a été réalisée dans le respect de la norme NF X 50-110 « Qualité en expertise - Prescriptions générales de compétence pour une expertise (Mai 2003) ».

L'expertise a été coordonnée par la Direction d'évaluation des produits réglementé (DEPR) avec la collaboration d'experts rapporteurs, d'experts du Pôle Recherche et Référence de l'Anses (laboratoire de Ploufragan-Plouzané-Niort et laboratoire de sécurité des aliments) et en collaboration avec la Direction de l'évaluation des risques de l'Anses (DER).

Les experts, la DEPR, la DER et le Pôle Recherche et Référence (laboratoire de Ploufragan-Plouzané-Niort et laboratoire de sécurité des aliments) se sont réunis par visioconférence les 3 et 10 juin 2020 et ont échangé par voie électronique. Sur la base de ces échanges, un projet d'analyse et de note a été rédigé par la coordination scientifique de la DEPR. Ce projet a été relu par les experts par voie télématique le 17 juin 2020.

L'expertise s'est appuyée sur :

- les informations utilisées lors des expertises conduites dans le cadre des saisines liées 2020-SA-0037 (Anses 2020), 2020-SA-0043 (Anses 2020a), 2020-SA-0056 (Anses 2020b) et 2020-SA-0059 (Anses 2020c) relatives au virus SARS-CoV-2 ;
- la littérature scientifique (accessible dans les conditions d'une expertise en urgence et dans l'état des connaissances au 3 juin 2020, sans viser une recherche bibliographique exhaustive) ;
- les protocoles de suivi d'abattement des phages dans les boues figurant en annexe 3 ;
- l'ensemble des normes citées dans les protocoles à l'exception du protocole D2 4.5 HOR-HYG développé dans le cadre du projet HORIZONTAL-HYG, inaccessible via le site du projet : <https://horizontal.ecn.nl/consultation-of-phase-ii/hygienic-parameters/index.html>.

L'Anses a analysé les liens d'intérêts déclarés par les experts avant leur nomination et tout au long des travaux, afin d'éviter les risques de conflits d'intérêts au regard des points traités dans le cadre de l'expertise.

Les déclarations d'intérêts des experts sont publiées sur le site internet de l'Anses (<https://dpi.sante.gouv.fr>).

### **2.1. ANALYSE CRITIQUE DES PROTOCOLES DE SUIVI D'ABATTEMENT DES PHAGES DANS LES BOUES**

Dans son avis du 27 mars 2020 (Anses 2020a), l'Agence émettait des recommandations au titre de l'acquisition des connaissances :

*« L'Anses note par ailleurs le caractère limité des données disponibles de contamination virale dans les effluents et l'évolution de celle-ci dans la filière d'assainissement et recommande d'acquérir des connaissances scientifiques complémentaires. En particulier, il serait important de pouvoir se référer à une échelle de pollution virale résiduelle ou à un abattement moyen en titre viral en fonction des pratiques. A ce titre, l'intérêt du suivi des bactériophages infectant les bactéries du tractus intestinal proposé depuis de nombreuses années comme indicateurs de pollution fécale ou virale (coliphages somatiques, phages ARN F-spécifiques) pourrait être approfondi (Martin-Diaz et al., 2020). Aussi, dans l'objectif d'acquisition de connaissances et comme déjà recommandé par l'Agence (Anses, 2018 ; Anses, 2019 et Afssa, 2009), la recherche*

*des coliphages somatiques et phages ARN F-spécifiques, dans les boues avant et après hygiénisation est recommandé. »*

Dans ce contexte, deux protocoles d'étude de suivi d'abattement des phages dans les boues ont été élaborés par l'Université de Lorraine, le Laboratoire national de métrologie et d'essais (LNE), la Fédération nationale des collectivités concédantes et régies (FNCCR) et la Fédération professionnelle des entreprises de l'eau (FP2PE) :

- *La première étude porte sur la cinétique d'élimination des bactériophages dans les boues liquides de STEU en laboratoire afin de définir des conditions de stockage pour obtenir 3 unités logarithmiques d'abattement.*
- *La seconde étude porte sur l'abattement moyen en bactériophages au cours des processus de stockage des boues in situ.*

Selon les auteurs, la finalité de ces études est de proposer aux exploitants et collectivités une méthode indirecte d'estimation de l'abattement du SARS-CoV-2 dans des boues non hygiénisées.

### **2.1.1. Remarques préliminaires**

Ces deux protocoles reposent sur le suivi des bactériophages ARN F-spécifiques et coliphages somatiques. Ces bactériophages sont classiquement utilisés comme indicateurs de contamination fécale et comme virus modèles des virus entériques humains pathogènes pour valider des processus d'inactivation virale et/ou réaliser des études de persistance. Ces bactériophages ont été choisis parce qu'ils seraient plus résistants que des virus enveloppés (Anses 2020a) et donc, *a priori*, que le SARS-CoV-2 (agent de la maladie COVID-19).

Les bactériophages sont des virus qui se reproduisent dans des bactéries hôtes et ceux choisis dans le protocole ont pour cibles des bactéries du tractus digestif humain ou animal (*Escherichia coli* ou espèces bactériennes proches). Ces bactéries, notamment *E. coli*, sont nombreuses dans les boues non hygiénisées concernées par le protocole expérimental.

Sur ces considérations, pour les boues n'ayant pas subi de traitements hygiénisants [au sens de l'arrêté du 8 janvier 1998 : réduction de l'ensemble des micro-organismes pathogènes (bactéries, virus et parasites)], les protocoles décrits présentent un intérêt pour valider des indicateurs d'efficacité de traitement d'inactivation virale au titre de l'acquisition des connaissances. Néanmoins quelques réserves sont émises sur l'utilisation des coliphages somatiques dans ce contexte.

En effet les coliphages somatiques représentent une très vaste gamme de phages ciblant, *a minima*, *E. coli* et il ne peut donc être exclu qu'ils pourraient se multiplier dans les bactéries hôtes retrouvées dans les boues n'ayant pas subi de traitements hygiénisants, qui eux détruisent les virus et leurs bactéries hôtes.

Il est par ailleurs rappelé que le lien entre abattement des phages ARN F-spécifiques et des phages somatiques comme indicateurs de la disparition des coronavirus SARS-CoV-2, peu justifié dans le document, reste à démontrer. En effet au regard de la bibliographie récente, ce lien est même difficilement justifiable. Des études, telles que celle de Chin *et al.* 2020 démontrant que le SARS-CoV-2 était résistant à des pH de 3 à 10 pendant 1 heure et celle de Shaper *et al.* 2002 montrant jusqu'à 2 log de réduction à pH 10 pour certaines souches de phages ARN F, rendent difficile la projection des résultats « phages » sur les SARS-CoV-2 éventuellement présents.

Une approche, plus directe, par recherche de traces de génome de SARS-CoV-2 par méthode PCR pourraient permettre de s'assurer de l'absence de SARS-CoV-2 dans les boues. Ainsi, si le génome du SARS-CoV-2 dans les boues non hygiénisées n'était pas détecté, cela garantirait l'absence de SARS-CoV-2 infectieux.

L'ensemble des remarques et critiques relatives aux aspects généraux du protocole est listé ci-dessous.

### **2.1.2. Analyse générale**

#### **Remarques générales**

- Le document doit préciser le mode de gouvernance, élément conditionnant le bon déroulement des études proposées : désignation de l'organisme pilote, des référents techniques et organisationnels.
- Le document proposé ne peut être considéré comme un protocole expérimental (i.e. reproductible tel quel en laboratoire) mais est plutôt une description du principe des méthodes mises en place, comprenant des parties générales et d'autres plus descriptives.

#### **Précisions à apporter/remarques : choix des bactériophages**

Il conviendrait :

- d'apporter des informations complémentaires pour justifier le choix des bactériophages retenus pour réaliser ces études : information sur la pertinence de leur utilisation comme virus modèle dans le cadre du suivi indirect du taux d'abattement du SARS-CoV-2, pertinence des choix en fonction des paramètres spécifiques liés au SARS-CoV-2 (préciser /citer la bibliographie par exemple, les temps de survie comparés permettant de justifier la pertinence de ces choix).
- d'ajouter des informations, en cas de choix autres que ceux proposés par les normes NF EN ISO 10705-1 et NF EN ISO 10705-2. Il conviendrait donc de citer et décrire les bactériophages témoins sélectionnés, indiquer les bactéries hôtes permettant leur multiplication, etc. Un tableau comparant des données sur la persistance de ces bactériophages et de virus enveloppés pourrait être ajouté en annexe pour illustrer le fait que les bactériophages retenus représentent bien un « worst case scenario ».
- de s'interroger sur l'utilisation possible d'autres virus modèles du SARS-CoV-2 : souches animales de coronavirus non pathogènes pour l'Homme, bactériophages enveloppés (similitudes structurales / SARS-CoV-2).
- de justifier l'objectif retenu de 3 log d'abattement.

#### **Précisions à apporter/remarques : objectifs et méthodes**

- Le protocole proposé est intéressant dans le cadre de l'acquisition de connaissances mais reste complexe à conduire en routine. En effet, la détection et le dénombrement des phages ARN F-spécifiques et des phages somatiques par les méthodes normalisées NF EN ISO 10705-1<sup>1</sup> et NF EN ISO 10705-2<sup>2</sup> sont peu mis en œuvre dans les laboratoires accrédités, avec des limites de détection à caractériser. Pour rappel, ce paramètre est fréquemment indiqué comme limitant dans le cadre des usages « Réutilisation des eaux usées épurées » (arrêté du 2 août 2010 modifié) du fait de la difficulté des laboratoires à mettre en évidence des phages dans les eaux brutes. Sur la base du rapport du laboratoire d'hydrologie de Nancy (LHN) d'avril 2020 (Anses, 2020d) non publié à ce jour, seuls 3 laboratoires sur les 134 agréés par le ministère de la santé et/ou de l'écologie sont accrédités en France pour l'analyse des phages ARN F sur matrices « Eaux propres et résiduaires » et aucun pour l'analyse de phages somatiques ni aucun sur la matrice « Boues » (annexe 4). Ces données sont corroborées par la consultation du site du COFRAC.

<sup>1</sup> Norme NF EN ISO 10705-1 : Qualité de l'eau Détection et dénombrement des bactériophages Partie 1 : Dénombrement des bactériophages ARN F Spécifiques

<sup>2</sup> Norme NF EN ISO 10705-2 Qualité de l'eau - Détection et dénombrement des bactériophages - Partie 2 : dénombrement des coliphages somatiques



- Les 2 normes d'essai citées sont anciennes (2001) et n'ont pas fait l'objet de révision. Les souches utilisées pour les faibles concentrations, portant le facteur F (WG49) sont peu stables, d'autres alternatives ont été proposées (Exemple souches proposées par la méthode 1601 de l'EPA<sup>3</sup>). Le domaine d'application des deux méthodes intègre la matrice « boues », mais les modalités de conservation des échantillons [conditions de stockage (température, durée)] ne sont pas spécifiquement indiquées, et renvoient vers d'autres normes.
- La norme NF EN ISO 10705-3 (2003)<sup>4</sup> porte sur la validation des méthodes de concentration des bactériophages, mais uniquement sur les matrices « eaux » pour des échantillons supposés contenir moins de 3 ufp<sup>5</sup>/mL. Toutefois, cette norme présente l'avantage de poser les principes de l'évaluation des performances, notamment sur le taux de récupération (intégrant transport et modalités de conservation). Les méthodes utilisées pour les boues, après une éventuelle adaptation, devront être décrites.
- Il conviendrait, pour la mise en œuvre de ces 2 normes « phages » sur les boues, de préciser les étapes de concentration et de désorption des phages de la matière organique et de porter une attention particulière à la l'évaluation de la limite de détection de la méthode.
- Les éléments relatifs aux étapes d'extraction des boues liquides et concentration (protocole D2 4.5 HOR.HYG<sup>6</sup>), étapes effectivement critiques, ne sont ni décrits, ni disponibles. Monpoeho *et al.*, 2000 propose une méthode de préparation des échantillons.

### **Précisions à apporter : abattement de 3 log proposé**

- Le protocole portant sur la cinétique d'élimination des bactériophages dans les boues liquides de STEU en laboratoire précise que les conditions de stockage recherchées sont celles qui permettront d'atteindre un abattement de 3 log. Il n'est pas précisé sur quelle base repose cette valeur.
- Il conviendrait de justifier ce choix afin de s'assurer qu'une diminution de 3 log est suffisante pour valider les conditions de stockage et valider l'absence de risque en se basant sur un scénario pire cas. En effet, les processus d'inactivation virale sont le plus souvent validés lorsqu'un abattement logarithmique de 4 est atteint (Elissade *et al.*, 1994).

### **2.1.3. Étude de la cinétique d'élimination des bactériophages dans les boues liquides de STEU.**

L'ensemble des remarques et critiques relatives au protocole de suivi de la cinétique d'élimination des bactériophages est listé ci-dessous.

### **Précisions à apporter : échantillons de boue et dopage avec les 2 bactériophages**

Certaines informations doivent être apportées afin de valider le protocole.

<sup>3</sup> Method 1601 (EPA)<sup>3</sup> : Male-specific (F+) and Somatic Coliphage in Water by Two-step Enrichment Procedure \_ Avril 2001. - [https://19january2017snapshot.epa.gov/sites/production/files/2015-12/documents/method\\_1601\\_2001.pdf](https://19january2017snapshot.epa.gov/sites/production/files/2015-12/documents/method_1601_2001.pdf)

<sup>4</sup> Norme NF EN ISO 10705-3 (2003) (Qualité de l'eau - Détection et dénombrement des bactériophages - Partie 3 : validation des méthodes de concentration des bactériophages dans l'eau)

<sup>5</sup> ufp : unité formant des plages

<sup>6</sup> Protocole D2 4.5 HOR-HYG développé dans le cadre du projet HORIZONTAL-HYG : Horizontal Standards on Hygienic Microbiological parameters for Implementation of EU Directives on Sludge, Soil and Treated Biowastes. (<https://horizontal.ecn.nl/consultation-of-phase-ii/hygienic-parameters/index.html>)

- Dans cette étude réalisée en laboratoire, les échantillons de boues seront artificiellement contaminés. Il conviendrait d'indiquer la charge virale inoculée et d'expliquer le raisonnement conduisant à la dose retenue.
- Tel qu'indiqué dans le document Aquaref<sup>7</sup>, la nécessité de prêter une très grande attention à la bonne homogénéité de la boue dopée et à la validation initiale de l'étude à J0 (valeur de référence), pour laquelle le nombre minimal de réplicats est lié à la performance de la méthode d'analyse (minimum 10 pour CVr<sup>8</sup> > 10%), est confirmée, ce qui doit être largement le cas pour l'ensemble du protocole analytique lié au dénombrement des phages. Dans ce protocole, il est proposé 3 échantillons de la boue liquide et 3 réplicats par flacon. Pour les autres temps de prélèvement et pour chaque condition, 3 répétitions minimales sont requises, spécification reprise dans le protocole. Même si cela permettra d'évaluer la bonne homogénéisation des échantillons inoculés, il serait préférable de prévoir la quantification initiale sur chacun des flacons à J0.

### **Précisions à apporter : conditions de stockage choisies**

- L'abattement des bactériophages sera déterminé à différents temps lors d'un stockage à 5°C et 20°C. Ces températures sont définies comme étant les températures extrêmes observées dans les silos de stockage au cours d'une année dans les STEU. Il aurait été utile de disposer en annexe des relevés de température qui ont permis de définir ces températures.
- Les températures choisies pour le protocole sont 5°C et 20°C. Il serait intéressant d'effectuer des mesures à 35°C (température observée en méthanisation mésophile notamment).
- D'autres paramètres (taux d'humidité, composition de l'atmosphère) doivent être pris en compte pour se rapprocher des conditions de stockage en silos.
- Des précisions sur la représentativité des conditions de stockage des boues liquides et de leur typologie auraient été souhaitées.

### **Précisions à apporter sur le choix des boues**

- Préciser les raisons ayant conduit à faire le choix de retenir des boues liquides produites par la STEU de Reims pour conduire cette étude.
- Préciser le type de boue sur lequel le protocole est mis en œuvre et comment les résultats seront extrapolés aux autres types de boues (effet de la déshydratation, du conditionnement...).
- Discuter la représentativité de cette boue (STEU de Reims) par rapport aux boues non hygiénisées le plus fréquemment produites en France.

### **Précisions à apporter sur le protocole de dénombrement des bactériophages et des contrôles qualités**

- Même si les contrôles qualité suivent les recommandations des normes en vigueur, seuls les contrôles des témoins positifs et négatifs (T+ et T-) sont indiqués comme « *a minima* ». Préciser si l'utilisation d'un contrôle de processus est prévue à chaque analyse d'échantillon pour valider l'efficacité d'extraction virale.
- Préciser comment est analysée la disparition des bactériophages et comment la représentation laboratoire versus conditions réelles est validée.

<sup>7</sup> Lignes directrices pour la conduite et la validation d'études de stabilité des paramètres physico-chimiques dans le domaine de l'eau – Aquaref – document final - Mars 2017 ([https://www.aquaref.fr/system/files/2016LNE\\_D2b\\_lignes\\_directrices\\_stabilite\\_VF\\_0.pdf](https://www.aquaref.fr/system/files/2016LNE_D2b_lignes_directrices_stabilite_VF_0.pdf))

<sup>8</sup> CVr : coefficient de variation répétabilité intralaboratoire

### Autre remarque

- Les méthodes à mettre en œuvre requièrent du temps « technicien » et exigent une expérience et une pratique régulière au regard de la nécessité de maintenir la collection de souches hôtes et le contrôle qualité associé. Ces éléments sont importants quant au choix du laboratoire (compétence, agrément, accréditation sur les méthodes et la matrice). Préciser et justifier le choix du laboratoire

#### **2.1.4. Étude de l'abattement moyen en bactériophages au cours des processus de stockage des boues *in situ*.**

- Préciser/décrire *a posteriori*, les différentes conditions de stockage. Pour le chaulage (nature de la chaux, taux de chaux introduite, pH et températures atteints, durée des conditions basiques), pour la méthanisation mésophile (temps de séjour, température atteinte), pour les traitements sous serre avec ou sans plancher chauffant (températures atteintes et temps de séjour des boues dans les serres).
- Préciser le nombre de jours écoulés entre le dernier apport de boues dans l'unité de stockage étudiée et le premier dénombrement de bactériophages considéré comme T0 de l'étude.
- Préciser si une seule analyse est réalisée à un temps donné ou si plusieurs analyses sont prévues si la diminution de 3 log n'a pas été atteinte.
- Soumettre la liste des 39 STEU retenues (sur la base des 3 critères suivants : Nombre Equivalent habitants, localisation géographique, type de stockage des boues) pour cette étude.
- Préciser, en plus de ce qui est prévu pour l'exploitation des résultats, les caractéristiques de la STEU et les éléments d'exploitation et résultats correspondant à la période de production des boues analysées.
- Préciser la typologie et la représentativité des boues au travers des 39 STEU retenues par rapport aux objectifs.
- Préciser les critères de choix du laboratoire qui procédera aux analyses.
- Les échantillons de boues qui seront analysés auront été stockés sous différentes conditions (stockage non aéré en boues liquides, boues chaulées, digestion anaérobie...). Préciser si la méthode d'analyse aura la même efficacité d'extraction virale en fonction du type d'échantillon et les contrôles qualité prévus pour l'analyse.

## **2.2. ACTUALISATION DES CONNAISSANCES**

### **2.2.1. Présence de SARS-CoV-2 dans les eaux usées/boues.**

Une analyse de la bibliographie, arrêtée au 21 avril 2020, concernant la présence du SARS-CoV-2 dans les eaux usées brutes et épurées a été publiée par l'Agence (Anses 2020c).

Depuis le 11 mars 2020, date à laquelle l'OMS a qualifié de pandémie la propagation du SARS-CoV-2, son suivi épidémiologique dans les eaux usées a été initié dans différents pays. Les Pays-Bas (Medama *et al.*, 2020 ; K-Lodder *et al.*, 2020), les Etats-Unis (Wu *et al.*, 2020 ; Memudryi *et al.*, 2020), l'Australie (Ahmed *et al.*, 2020), la France (Wurtzer *et al.*, 2020), la Chine (Wang *et al.*, 2020), l'Espagne (Randazzo *et al.*, 2020a ; Randazzo *et al.*, 2020b), l'Italie (La Rosa *et al.*, 2020 ; Rimoldi *et al.*, 2020), Israël (Or *et al.*, 2020) et la Turquie (Alpaslan Kocamemi *et al.*, 2020), ont ainsi quantifié les génomes de SARS-CoV-2 dans les eaux usées en utilisant différentes techniques de concentration de virus.



En France, un programme de suivi épidémiologique des eaux usées comme indicateur privilégié dans une stratégie de lutte intégrée contre la CODIV-19, le projet OBEPINE<sup>9</sup> (OBServatoire EPIdémiologique daNs les Eaux usées), a été initié.

Par ailleurs, 2 articles récents en prépublication (« preprint ») indiquent, d'une façon générale, et comme observée pour d'autres virus, la présence d'ARN du SARS-CoV-2 dans les boues primaires ou épaissies produites par les STEU lors de la période épidémique (Jordan Peccia *et al.* 2020 ; Balboa *et al.* 2020).

L'étude de Balboa *et al.* (2020) montre que, lors du passage dans la STEU, le matériel génétique du SARS-CoV-2 semble se concentrer dans les boues primaires ou épaissies. Balboa *et al.* (2020) ne montrent par ailleurs aucune présence d'ARN du SARS-CoV-2, ni dans les eaux épurées, ni dans les boues ayant subi une hydrolyse thermique suivi d'une digestion anaérobie.

En France, lors de la situation épidémique telle que relevée mi-mars 2020, 10<sup>4</sup> à 10<sup>6</sup> copies génomes de SARS-CoV-2 par litre (en moyenne sur 24 échantillons sur 2 semaines de prélèvement) ont été retrouvées dans les eaux usées brutes d'Ile de France, avec une variation de la charge génomique virale liée à la situation épidémique, aussi bien lors de l'accroissement des cas que lors de leur diminution (Wurtzer *et al.*, 2020).

L'ensemble de ces données montre la présence de génomes du SARS-CoV-2 dans des eaux usées brutes, dans les boues issues du traitement de ces eaux ou dans les eaux épurées, sans toutefois préciser, ni la persistance, ni l'intégrité du virus dans ces milieux, ni le risque infectieux associé.

Dans l'étude de Rimoldi *et al.* (2020), des échantillons d'eaux usées brutes (ayant un temps d'acheminement vers la STEU de 6 à 8 heures à une température de 15°C - 20°C) et épurées après traitement et désinfection (acide peracétique ou lampes UV), issus de 3 STEU de la région de Milan en Italie, ont été prélevés les 14 et 22 avril 2020. Cette étude indique que la présence de particules infectieuses du SARS-CoV-2 n'a pas pu être mise en évidence [effet cytopathique (ECP) non détecté sur les cellules Vero E6], malgré le nombre élevé de génomes viraux présents dans les échantillons. Cependant, cette étude ne présente pas de témoin positif (montrant un ECP après infection des cellules Véro E6 par le SARS-CoV-2), qui permettrait de déterminer à partir de quel titre viral dans le liquide prélevé il est possible de ré-isoler le SARS-CoV-2. Publiée en « preprint », cette étude n'a pas, à la date de la présente note, été validée par un comité de lecture.

### 2.2.2. Efficacité des procédés appliqués aux boues en ce qui concerne l'abattement du SARS-CoV-2.

Une analyse de la bibliographie, arrêtée au 21 avril 2020, concernant l'efficacité des procédés d'hygiénisation des boues vis-à-vis du SARS-CoV-2 a été publiée par l'Agence (Anses 2020a, Anses 2020b et Anses 2020c).

Ligocka *et al.* (2016) ont montré que la digestion mésophile (37°C) de déchets de sous-produit animaux est, pour un temps de séjour de 28 jours, efficace sur l'élimination d'entérovirus bovins (artificiellement introduits dans le digesteur). Par ailleurs la digestion thermophile (55°C) montre une efficacité sur ces mêmes entérovirus après seulement 2 heures de digestion.

À date, aucune autre donnée nouvelle n'a été identifiée dans la littérature.

<sup>9</sup> <https://www.sfm-microbiologie.org/2020/05/12/le-suivi-epidemiologique-des-eaux-usees-un-indicateur-privilegie-dans-une-strategie-de-lutte-integree-contre-le-codiv-19/>

### 2.2.3. Procédés, pour les boues non hygiénisées, qui pourraient conduire à un abattement des teneurs en virus notamment la durée de stockage et la température

À date, aucune donnée nouvelle n'a été identifiée dans la littérature.

### 2.2.4. Présence de particules infectieuses du SARS-COV2 dans différentes matrices (eaux, boues et aérosols issus d'eaux usées).

L'état des connaissances concernant l'infectiosité du SARS-CoV-2, arrêté au 21 avril 2020 et réalisé par l'Agence (Anses 2020c), a été complété.

Aucune étude validée à date n'a été retrouvée dans la littérature.

Ainsi, considérant les données existantes, la présence de particules infectieuses du SARS-CoV-2 excrétées dans les selles et retrouvées dans les eaux usées n'a, à ce jour toujours, pas été démontrée.

Les traces de génomes du SARS-CoV-2 détectés dans les eaux usées ne renseignent pas sur son caractère infectieux.

Par ailleurs, une étude réalisée en laboratoire, testant la persistance des coronavirus dans des aérosols destinés à reproduire une excrétion respiratoire, montre que le caractère infectieux du SARS-CoV-2 dans les aérosols pourrait perdurer jusqu'à 16 heures (Fears *et al.*, 2020). Aucune étude testant la présence du SARS-CoV-2 dans les aérosols provenant des eaux usées n'a été trouvée dans la littérature.

## 3. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail a été saisie le 14 mai 2020 par l'association Robin des Bois et le 19 mai 2020 par le Ministère de la Transition écologique et solidaire (Direction générale de l'aménagement, du logement et de la nature). Ces 2 saisines sont déposées dans le contexte de la contamination possible par le virus SARS-CoV-2 (agent de la maladie COVID-19) des boues issues des stations d'épuration.

Il était plus précisément demandé à l'Agence de réaliser une analyse critique des protocoles proposés de suivi d'abattement des phages dans les boues et d'actualiser les connaissances concernant la présence de SARS-CoV-2 dans les eaux usées/boues, de compléter les connaissances relatives à l'efficacité des procédés d'hygiénisation des boues en ce qui concerne l'abattement du SARS-CoV-2, de documenter, pour les boues non hygiénisées, les procédés qui pourraient conduire à un abattement de la charge virale, notamment la durée de stockage et la température, et, le cas échéant, les connaissances à acquérir, de préciser les modalités de protection des travailleurs et d'actualiser les connaissances concernant l'infectiosité du SARS-CoV-2 retrouvé dans différentes matrices.

### **Commentaires concernant les protocoles de suivi d'abattement des phages dans les boues**

Des recommandations, remarques et commentaires sur les protocoles proposés sont présentés dans le corps de cette note.

L'Anses confirme par ailleurs que, pour les boues n'ayant pas subi de traitements hygiénisants (au sens de l'arrêté du 8 janvier 1998), les protocoles décrits présentent un intérêt pour valider des indicateurs d'efficacité de traitement d'inactivation virale au titre de l'acquisition des. Néanmoins, quelques réserves sont émises sur l'utilisation des coliphages somatiques dans ce contexte.

L'Anses souligne que le lien spécifique entre la cinétique d'abattement des phages ARN F spécifiques et des phages somatiques utilisés comme indicateurs et la disparition des coronavirus SARS-CoV-2,

reste à démontrer et qu'en l'absence de comparaison avec SARS-CoV-2, les conclusions resteront difficiles à généraliser.

L'Anses précise également que d'autres approches, plus directes, comme la démonstration de l'absence du génome viral du SARS-CoV-2 dans les boues non hygiénisées pourraient permettre de s'assurer de l'absence de SARS-CoV-2 infectieux dans ces dernières.

### **Actualisation des connaissances concernant le virus SARS-CoV-2 dans les boues**

- L'analyse de la bibliographie, arrêtée au 3 juin 2020, confirme la présence de génomes du SARS-CoV-2 dans des eaux usées brutes, dans les boues issues du traitement de ces eaux ou dans les eaux épurées, sans toutefois préciser, ni la persistance, ni l'intégrité du virus dans ces milieux, ni le risque infectieux associé.
- Aucune donnée ne permet, au 3 juin 2020, d'actualiser l'efficacité des procédés d'hygiénisation des boues en ce qui concerne l'abattement du SARS-CoV-2.
- Aucune donnée ne permet au 3 juin 2020 d'actualiser la liste des procédés qui pourraient conduire à un abattement du SARS-CoV-2 (durée de stockage ou température).
- Aucune donnée ne permet, au 3 juin 2020, de définir le caractère infectieux du SARS-CoV-2 provenant de différentes matrices (eaux usées brutes, eaux traitées ou boues).

Les conclusions émises dans le cadre de la note en réponse à la saisine n° 2020-SA-0059 (Anses 2020c) restent donc inchangées.

L'Agence souligne à nouveau le nombre limité d'études et données disponibles concernant le virus SARS-CoV-2 dans les boues issues des STEU. L'acquisition de données expérimentales et/ou des informations complémentaires sur la quantification, l'infectiosité et la persistance du virus SARS-CoV-2 dans les différents milieux (notamment eaux usées brutes et boues), ainsi que chez l'Homme (tropisme digestif, excrétion de virus infectieux dans les selles) pourrait permettre de lever un grand nombre d'incertitudes. L'Anses rappelle que l'avis<sup>10</sup> de l'académie des technologies du 24 avril 2020 recommande également que des travaux soient menés sur ces sujets.

Par ailleurs, l'Agence rappelle que, selon l'avis du HCSP (HCSP, 2020), le mode de transmission majoritaire du SARS-CoV-2 est la voie respiratoire. Ainsi, la préoccupation majeure concerne l'exposition aux aérosols et aux poussières susceptibles d'être émis au cours de l'épandage et de l'enfouissement des boues non hygiénisées.

Ainsi, en ce qui concerne la protection des travailleurs intervenant dans les STEU et des utilisateurs au moment de l'épandage, considérant que les informations restent insuffisantes pour renseigner le maintien ou non, ainsi que l'évolution au cours du temps du pouvoir infectieux des coronavirus dans les boues non hygiénisées, il conviendra de porter des équipements de protection individuelle (EPI) appropriés (HCSP, 2020). Le port d'EPI doit être associé à des réflexes d'hygiène (ex : lavage des mains, douche en fin d'activité) et à un comportement rigoureux (ex procédure d'habillage/déshabillage). Il est à noter que les équipements de protection collective sont à mettre en œuvre avant ceux relatifs à la protection individuelle.

L'Anses rappelle que ces mesures de protection sont par essence déjà nécessaires pour faire face aux autres charges bactériologiques ou virales inhérentes aux produits considérés (eaux usées ou boues) (Afsset, 2009).

<sup>10</sup> <https://www.academie-technologies.fr/blog/categories/publications-de-l-academie/posts/avis-de-l-academie-des-technologies-relatif-a-la-presence-et-a-l-activite-du-coronavirus-sars-cov-2-dans-les-eaux-usees>

### **Recommandations de l'Agence**

Actuellement, l'épandage des boues n'ayant pas subi de traitements considérés hygiénisants au sens de l'arrêté du 8 janvier 1998 et produites au cours de la période épidémique n'est pas autorisé (Arrêté du 30 avril 2020).

Les données disponibles restent insuffisantes pour démontrer le lien entre cinétique d'abattement des indicateurs phages ARN F-spécifiques et phages somatiques et abattement du SARS-CoV-2. Le suivi indirect du taux d'abattement des bactériophages (ARN F-spécifiques et coliphages somatiques) dans les boues ne permet donc pas de s'affranchir des dispositions de l'arrêté du 30 avril 2020 (hygiénisation préalable des boues avant épandage).

Par ailleurs, selon le rapport du LHN d'avril 2020 (Anses, 2020d), 12 laboratoires parmi ceux agréés par les ministères en charge de la santé et/ou de l'écologie ont été identifiés comme disposant d'un mode opératoire de détection/quantification applicable au génome de SARS-CoV-2. Certains de ces laboratoires ont une activité détection/quantification effective (si les analyses réalisées sur échantillons biologiques sont intégrées). Parmi ces laboratoires, certains disposent de données de validation et certains seraient en mesure de mettre en œuvre des analyses de détection/quantification de génome de SARS-CoV-2 sur des matrices résiduelles (boues). Certains laboratoires proposent une analyse qualitative sur boues et disposent également d'un mode opératoire d'extraction/purification du génome de SARS-CoV-2 pour ces mêmes matrices résiduelles.

**Ainsi, considérant la capacité analytique des laboratoires en France, l'Anses préconise en première intention de procéder pour les boues non hygiénisées, à la recherche de génome viral de SARS-CoV-2 directement dans ces boues.**

L'absence de génome viral de SARS-CoV-2 dans les boues analysées, dans les conditions de contrôle qualité adaptée, est synonyme d'absence de SARS-CoV-2 infectieux (Afssa, 2007) et pourrait permettre l'épandage de ces boues. En effet, si la présence de génome viral est difficilement interprétable en termes de risques sanitaires induits, *a contrario*, l'absence de génome viral permet de garantir l'absence de virus infectieux dans la prise d'essai ayant fait l'objet de l'analyse.

Toutefois, dans le cadre de ces analyses une attention particulière devra être portée sur la méthode d'analyse, sa validation, sa limite de détection qui devra être la plus basse possible ainsi que sur la méthode d'échantillonnage ou encore la méthode de conservation des échantillons.

En cas de présence de génome viral dans les boues analysées, l'épandage ne pourra être réalisée qu'après hygiénisation des boues ou démonstration par de nouvelles analyses ou par un protocole spécifique adapté (validé par une autorité sanitaire), après stockage additionnel, l'absence de SARS-CoV-2. Cependant, les données actuelles ne permettant pas de définir avec précision les conditions de stockage (notamment les couples temps et températures) permettant un abattement des teneurs en SARS-CoV-2 dans les boues non hygiénisées. Des connaissances doivent être produites afin de définir ces conditions.

Par ailleurs, l'Anses restera attentive aux études et informations à venir susceptibles de faire évoluer cette évaluation.

Dr. Roger Genet



**MOTS-CLES**

SARS-CoV-2, COVID-19, coronavirus, assainissement, hygiénisation, station d'épuration, eaux usées, STEU, boues, transmission, épandage, protocole, abattement.

**BIBLIOGRAPHIE**

- Afssa. 2007. "Bilan des connaissances relatives aux virus transmissibles à l'homme par voie orale."
- Afsset 2009. Virus Influenza pandémique A (H1N1) 2009 : évaluation du risque sanitaire pour les travailleurs de l'assainissement des eaux usées.
- Anses 2020. "Avis relatif à une demande urgente sur certains risques liés au COVID-19 - saisine 2020-SA-0037."
- Anses 2020a. "Avis relatif à une demande en urgence d'appui scientifique et technique sur les risques éventuels liés à l'épandage de boues d'épuration urbaines durant l'épidémie de COVID-19 - saisine 2020-SA-0043."
- Anses 2020b. "Avis de l'Anses relatif à une demande en urgence d'appui scientifique et technique sur les risques éventuels liés à l'épandage de boues d'épuration industrielles durant l'épidémie de COVID-19. Saisine n° 2020-SA-0056."
- Anses 2020c. « Note d'appui scientifique et technique de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relative à l'état des connaissances disponibles sur la présence, l'infectiosité et la persistance du virus SARS-CoV-2 dans le milieu aquatique ». Saisine n° 2020-SA-0059.
- Anses 2020d. Rapport du Laboratoire d'hydrologie de Nancy (LHN) «Etat des lieux des capacités analytiques des laboratoires (mesures directes et indirectes) concernant le sars-cov-2 dans les matrices résiduaires » avril 2020 (non publié).
- AHMED, Warish, ANGEL, Nicola, EDSON, Janette, *et al.* First confirmed detection of SARS-CoV-2 in untreated wastewater in Australia: A proof of concept for the wastewater surveillance of COVID-19 in the community. *Science of The Total Environment*, 2020, p. 138764.
- BALBOA, Sabela, MAURICIO-IGLESIAS, Miguel, RODRÍGUEZ, Santiago, MARTÍNEZ-LAMAS, Lucía, VASALLO, Francisco J., REGUEIRO Benito, LEMA, Juan M. The fate of SARS-CoV-2 in wastewater treatment plants points out the sludge line as a suitable spot for incidence monitoring. *medRxiv*, 2020. (Preprint)
- CHIN, Alex, CHU, Julie, PERERA, Mahen, *et al.* Stability of SARS-CoV-2 in different environmental conditions. *The lancet microbe*, 2020.
- ELISSALDE, Nicolas et GANIERE, Jean-Pierre. *Les germes pathogènes dans les boues résiduaires des stations d'épuration urbaines*. Ademe, 1994.
- FEARS, Alyssa C., KLIMSTRA, William B., DUPREX, Paul, *et al.* Comparative dynamic aerosol efficiencies of three emergent coronaviruses and the unusual persistence of SARS-CoV-2 in aerosol suspensions. *medRxiv*, 2020. (Preprint)
- Haut Conseil de la santé publique (HCSP). Avis relatif à la réduction du risque de transmission du SARS-CoV-2 par la ventilation et la gestion des effluents des patients COVID-19 - 17 mars 2020.
- KOCAMEMI, Bilge Alpaslan, KURT, Halil, HACIOGLU, Sabri, *et al.* First Data-Set on SARS-CoV-2 Detection for Istanbul Wastewaters in Turkey. *medRxiv*, 2020. (Preprint)
- LA ROSA, Giuseppina, IACONELLI, Marcello, MANCINI, Pamela, *et al.* First detection of SARS-CoV-2 in untreated wastewaters in Italy. *Science of The Total Environment*, 2020, p. 139652.
- LIGOCKA, Anna, PALUSZAK, Zbigniew, et GUT, WŁODZIMIERZ. Composting and anaerobic digestion technologies as methods for reduction of virus transmission in the environment. *Environment Protection Engineering*, 2016, vol. 42, no 2.
- LODDER, W. et DE RODA HUSMAN, A. M. SARS-CoV-2 in wastewater: potential health risk, but also data source. *The lancet. Gastroenterology & Hepatology*, 2020, vol. 5, no 6, p. 533-534.
- MEDEMA, Gertjan, HEIJNEN, Leo, ELSINGA, Goffe, *et al.* Presence of SARS-Coronavirus-2 in sewage. *MedRxiv*, 2020. (Preprint)
- MONPOEHO, S., DEHEE, A., MIGNOTTE, B., *et al.* Quantification of enterovirus RNA in sludge samples using single tube real-time RT-PCR. *Biotechniques*, 2000, vol. 29, no 1, p. 88-93.



- NEMUDRYI, Artem, NEMUDRAIA, Anna, SURYA, Kevin, *et al.* Temporal detection and phylogenetic assessment of SARS-CoV-2 in municipal wastewater. *medRxiv*, 2020. (*Preprint*)
- OR, Itay Bar, YANIV, Karin, SHAGAN, Marilou, *et al.* Regressing SARS-CoV-2 sewage measurements onto COVID-19 burden in the population: a proof-of-concept for quantitative environmental surveillance. *medRxiv*, 2020. (*Preprint*)
- PECCIA, Jordan, ZULLI, Alessandro, BRACKNEY, Doug E., *et al.* SARS-CoV-2 RNA concentrations in primary municipal sewage sludge as a leading indicator of COVID-19 outbreak dynamics. *medRxiv*, 2020. (*Preprint*)
- RANDAZZO, Walter, CUEVAS-FERRANDO, Enric, SANJUAN, Rafael, *et al.* Metropolitan Wastewater Analysis for COVID-19 Epidemiological Surveillance. *medRxiv*, 2020a. (*Preprint*)
- RANDAZZO, Walter, TRUCHADO, Pilar, FERRANDO, Enric Cuevas, *et al.* SARS-CoV-2 RNA titers in wastewater anticipated COVID-19 occurrence in a low prevalence area. *medRxiv*, 2020b. (*Preprint*)
- RIMOLDI, Sara Giordana, STEFANI, Fabrizio, GIGANTIELLO, Anna, *et al.* Presence and vitality of SARS-CoV-2 virus in wastewaters and rivers. *medRxiv*, 2020. (*Preprint*)
- SCHAPER, M., DURAN, A. E., *et* JOFRE, J. Comparative resistance of phage isolates of four genotypes of F-specific RNA bacteriophages to various inactivation processes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2002, vol. 68, no 8, p. 3702-3707.
- WANG, Jie, FENG, Haiting, ZHANG, Sheng, *et al.* SARS-CoV-2 RNA detection of hospital isolation wards hygiene monitoring during the Coronavirus Disease 2019 outbreak in a Chinese hospital. *International Journal of Infectious Diseases*, 2020
- WU, Fuqing, XIAO, Amy, ZHANG, Jianbo, *et al.* SARS-CoV-2 titers in wastewater are higher than expected from clinically confirmed cases. *medRxiv*, 2020. (*Preprint*)
- WURTZER, Sebastien, MARECHAL, Vincent, MOUCHEL, Jean-Marie, *et al.* Time course quantitative detection of SARS-CoV-2 in Parisian wastewaters correlates with COVID-19 confirmed cases. *medRxiv*, 2020. (*Preprint*)

### **Références réglementaires :**

- Arrêté du 30 avril 2020 précisant les modalités d'épandage des boues issues du traitement des eaux usées urbaines pendant la période de covid-19.
- Arrêté du 2 août 2010 relatif à l'utilisation d'eaux issues du traitement d'épuration des eaux résiduaires urbaines pour l'irrigation de cultures ou d'espaces verts.

## ANNEXE 1

### Présentation des intervenants

**PRÉAMBULE** : Les experts membres de comités d'experts spécialisés, de groupes de travail ou désignés rapporteurs sont tous nommés à titre personnel, *intuitu personae* et ne représentent pas leur organisme d'appartenance

#### EXPERTS RAPPORTEURS

---

M. DAGOT Christophe – Enseignant Chercheur – ENSIL – ESTER – expert filière STEP – traitement des boues

Mme DEPORTES Isabelle – Ingénieure impacts sanitaires et environnementaux de la gestion des déchets à l'ADEME – spécialiste traitements des déchets – membre du CES Matières Fertilisantes et supports de cultures de l'Anses

M. MOULIN Laurent – Responsable R&D – Eau de Paris – Microbiologie, Virologie, Amibes, microbiome, méthode de l'analyse.

Mme MARTIN-LATIL Sandra – Chargée de projets scientifiques – Anses, Laboratoire de sécurité des aliments – virologie alimentaire, culture cellulaire, outils de diagnostic et de détection, hygiène des aliments.

#### PARTICIPATION ANSES

---

##### Coordination scientifique – DEPR - UCIV

M. DUMENIL Jean-Rémi - Coordinateur scientifique - Pôle Matières Fertilisantes et Supports de Cultures - Unité de Coordination des Intrants du Végétal – Anses

Mme MERIGOUT Patricia - Coordinatrice scientifique - Pôle Matières Fertilisantes et Supports de Cultures - Unité de Coordination des Intrants du Végétal – Anses.

M. PINTE Jérémy - Cheffe de l'Unité de Coordination des Intrants du Végétal – Anses.

##### Contribution scientifique Pole Recherche et Référence

M. SALVAT Gilles - Directeur Général Délégué Recherche et Référence - Directeur de la santé animale et du bien-être des animaux.

M. ETERRADOSSI Nicolas - Directeur du Laboratoire de Ploufragan-Plouzané (Anses). Laboratoire spécialisé dans la santé des volailles, du lapin, des porcs, des ruminants et des poissons d'élevage.

##### Contribution scientifique DER - UERE

Mme WESTERBERG Estelle - Chef de projets scientifiques – Unité Evaluation des risques liés à l'eau – Anses.

Mme PANETIER Pascale - Cheffe de l'unité Evaluation des risques liés à l'eau – Anses.

**ANNEXE 2**

**LETTRE DE SAISINE - ASSOCIATION ROBIN DES BOIS**

2020-SA-0069

---

De: Saisines  
À: Saisines  
Objet: Boues de STEU - Saisine en urgence de l'ANSES par l'ONG Robin des Bois

Début du message transféré :

Expéditeur: Robin des Bois <[contact@robindesbois.org](mailto:contact@robindesbois.org)>  
Date: 14 mai 2020 à 16:19:41 UTC+2  
Destinataire: Directeur Général Anses <[dg@anses.fr](mailto:dg@anses.fr)>  
Cc: "Cedric BOURILLET@developpement-durable.gouv.fr" <[Cedric.BOURILLET@developpement-durable.gouv.fr](mailto:Cedric.BOURILLET@developpement-durable.gouv.fr)>, "Stephanie DUPUY-LYON@developpement-durable.gouv.fr" <[Stephanie.DUPUY-LYON@developpement-durable.gouv.fr](mailto:Stephanie.DUPUY-LYON@developpement-durable.gouv.fr)>, Jérôme Salomon <[jerome.salomon@sante.gouv.fr](mailto:jerome.salomon@sante.gouv.fr)>, Bruno Ferreira <[Bruno.Ferreira@Agriculture.Gouv.Fr](mailto:Bruno.Ferreira@Agriculture.Gouv.Fr)>  
Objet: Boues de STEU - Saisine en urgence de l'ANSES par l'ONG Robin des Bois

Paris, le 14 mai 2020



**Objet : Réévaluation des risques éventuels liés à la manipulation, au transport, à l'entreposage intermédiaire et à l'épandage des boues de stations d'épuration urbaines sur les sols agricoles, en forêt ou à des fins de végétalisation ou de reconstitution de sols.**

Monsieur le directeur général,

- Considérant l'avis de l'ANSES en date du 9 mars 2020 (1) mentionnant la présence possible de génome du SARS-CoV-2 responsable de l'épidémie Covid-19 dans les selles des personnes contaminées,

- Considérant l'avis de l'ANSES en date du 27 mars 2020 (2) mentionnant notamment que « la charge potentielle en SARS-CoV-2 dans les boues après hygiénisation pourrait être éliminée sous réserve d'une contamination initiale faible »,

- Considérant que l'avis de l'ANSES précité déclare en sa conclusion que « l'ANSES restera attentive aux études et informations à venir susceptibles de faire évoluer cette évaluation »,

- Considérant qu'une étude scientifique publiée le 6 mai 2020 (3) atteste de la présence le 9 avril 2020 de 3 millions d'unités de génome du SARS-CoV-2 dans les eaux usées brutes à l'entrée de 3 stations d'épuration de Paris et de la région parisienne,

- Considérant que cette quantité ne peut pas a priori être qualifiée de « faible »,

- Considérant que la résilience, le caractère infectieux ou l'inactivation du génome du SARS-CoV-2 ne sont pas connus dans le compartiment boues,

- Considérant que les boues des stations d'épuration de Paris et des communes périphériques sont notamment « exportées » dans les départements de l'Eure, de la Seine-Maritime, de l'Aisne, du Loiret, de l'Oise et de la Somme et que les boues de stations d'épuration d'autres régions particulièrement contaminées comme le Grand-Est, les Hauts-de-France, l'Auvergne-Rhône-Alpes et Provence-Alpes-Côtes-d'Azur sont elles aussi épandues,

- Considérant que ces transferts de boues sont susceptibles d'être des sources supplémentaires de contaminations croisées et de propagation de l'épidémie,

L'association Robin des Bois vous demande de bien vouloir émettre dans les meilleurs délais une mise à jour de votre premier avis sur les risques éventuels liés à la manipulation, au transport, à l'entreposage intermédiaire et à l'épandage des boues de STEU sur les sols agricoles en l'élargissant aux épandages en forêt, à des fins de végétalisation et de reconstitution de sols tels qu'autorisés par l'arrêté du 30 avril 2020 (4).

Les boues de stations d'épuration sont connues pour concentrer tous les polluants chimiques, métalliques et bactériologiques contenus dans les eaux usées brutes. Le titre viral de 3 millions d'unités de génome de SARS-CoV-2 par litre constaté le 9 avril 2020 dans les eaux brutes du Grand Paris est susceptible d'avoir augmenté à cause des orages du 9 mai et du lessivage de la voirie publique, à cause des différents effets du déconfinement collectif en cours, de la multiplication possible des porteurs asymptomatiques et confirmés, de la dispersion sur le domaine public de masques et de gants de protection abandonnés et des eaux de lavage dans les foyers domestiques des masques dits grand public.

Avec nos remerciements et nous tenant à votre disposition pour toute information complémentaire,

Jacky Bonnemains et Charlotte Nithart,  
Robin des Bois

-----

- (1) Avis relatif à une demande urgente sur certains risques liés au Covid-19 formulée par le ministère de l'Agriculture
- (2) Avis relatif à une demande d'appui scientifique et technique sur les risques éventuels liés à l'épandage de boues d'épuration urbaines durant l'épidémie de Covid-19 formulée par le ministère de l'Agriculture et le ministère de l'Ecologie
- (3) WURTZER S, MARECHAL V, MOUCHEL JM, MOULIN L (2020) Time course quantitative detection of SARS-CoV-2 in Parisian wastewaters correlates with Covid-19 confirmed cases
- (4) Arrêté précisant les modalités d'épandage des boues issues du traitement des eaux usées urbaines pendant la période de Covid-19

--

**ROBIN DES BOIS**  
Association de protection de l'Homme et de l'environnement  
Depuis 1985 / Since 1985  
tel: +33 (0)1 48 04 09 36 - fax: +33 (0)1 48 04 56 41  
[www.robindesbois.org](http://www.robindesbois.org)  
[Twitter](#) | [Facebook](#)



**ANNEXE 3**

**LETTRE DE SAISINE - MINISTERE DE LA TRANSITION ECOLOGIQUE ET SOLIDAIRE & PROTOCOLES DE SUIVI  
D'ABATTEMENT DES PHAGES DANS LES BOUES**



Direction générale de l'aménagement,  
du logement et de la nature

2020-SA-0068

La Défense, le 15 mai 2020

Direction de l'eau et de la biodiversité  
Sous-direction de la protection et de la gestion de l'eau,  
des ressources minérales et des milieux aquatiques

Le Directeur de l'eau et de la biodiversité

à

Monsieur le Directeur Général  
Agence nationale de sécurité sanitaire de  
l'alimentation, de l'environnement et du travail,  
14 rue Pierre et Marie Curie  
94701 MAISONS ALFORT CEDEX

**Objet : Demande d'appui scientifique et technique**

**PJ : 2 projets de protocole suivi abattement des phages dans les boues**

Comme suite à votre avis du 27 mars 2020 sur les risques liés à l'épandage des boues durant l'épidémie de Covid 19, une instruction aux préfets a été signée en urgence le 2 avril 2020 par la DGALN et le DGAL reprenant les recommandations de l'Anses. Un arrêté du 20 avril 2020 est venu confirmer l'interdiction de l'épandage de boues non hygiénisés.

La pratique de déshydratation et d'hygiénisation des boues n'étant pas si fréquente notamment au sein des petites collectivités, certains exploitants de stations d'épuration se sont organisés pour envoyer leurs boues vers d'autres stations d'épuration pratiquant l'hygiénisation ou ont fait appel à des unités de déshydratation mobiles avant compostage ou chaulage. Ces pratiques sont onéreuses mais vont pouvoir bénéficier d'aides des agences de l'eau. Pour autant, il nous faut envisager des pratiques plus adaptées au contexte local au cas où cette crise sanitaire perdurerait.

En collaboration avec le laboratoire national de métrologie et d'essais (LNE), Monsieur Gantzer, microbiologiste à l'université de Lorraine, la fédération nationale des collectivités concédantes et en régie (FNCCR) et la fédération professionnelle des entreprises de l'eau (FP2E) et notamment la filiale Suez, deux protocoles ont pu être élaborés pour que les exploitants et collectivités puissent suivre le taux d'abattement du SARS-CoV-2 de manière indirecte dans les stations de traitement des eaux usées ne pratiquant pas l'hygiénisation.

Ces protocoles vont permettre d'étudier le taux d'abattement de bactériophages dans les boues en l'attente d'une méthode normalisée de suivi du virus lui-même dans les boues. Les bactériophages ARN F spécifiques et coliphages somatiques vont être suivis car ils présentent des profils de résistances au pH et thermiques différentes. Ces bactériophages présentent des durées de survie reconnues supérieures à celles des virus enveloppés et donc *a priori* le SARS-CoV-2. Ils sont considérés comme des indicateurs pertinents pour évaluer l'efficacité des traitements appliqués à des eaux résiduaires ou à des boues.



**MINISTÈRE  
DE LA TRANSITION  
ÉCOLOGIQUE  
ET SOLIDAIRE**

*Liberté  
Égalité  
Fraternité*

**Direction générale de l'aménagement,  
du logement et de la nature**

Le premier protocole consiste en une étude de la cinétique d'abattement en fonction du temps et de la température à partir d'un seul échantillon d'une station de traitement des eaux usées de la ville de Reims. Le second protocole est constitué du suivi de l'abattement des bactériophages pour différentes typologies de stockage des boues. A ce stade, près de 40 collectivités ou exploitants se sont portés volontaires.

Nous souhaitons que ces protocoles décrits en annexe de ce courrier permettent d'apporter des éléments tangibles et robustes à l'ANSES pour déroger à l'exigence d'hygiénisation des boues. Ainsi, je souhaiterais avoir votre avis sur ces protocoles assez rapidement, les premiers prélèvements auront lieu à partir du 25 mai. Les résultats définitifs seront disponibles fin juin et transmis à l'Anses pour avis.

Le directeur de l'eau et de la biodiversité

Olivier Thibault

**Copie à :**

- Bruno Ferreira, DGAL/MAA
- Cédric Bourrillet, DGPR/MTES
- Jérôme Salomon, DGS/MSS

## PROTOCOLE D'ETUDE PHAGESBOUES – V3

LNE : Nathalie Guigues, Sophie Lardy-Fontan

LCPME : Christophe Gantzer

### OBJECTIFS :

Construire un protocole pour que les exploitants et collectivités puissent suivre le taux d'abattement SARS-CoV-2 de manière indirecte dans les STEU ne pratiquant pas l'hygiénisation.

Amener des éléments tangibles et robustes à l'ANSES pour déroger à l'exigence d'hygiénisation des boues (Saisine n° 2020-SA-0043).

### CALENDRIER :

Démarrage le plus vite possible pour être en phase avec les prochaines périodes d'épandages qui auront lieu après les moissons (juin/juillet).

Démarche :

Proposition de conduire deux études qui amènent des informations complémentaires.

- A. Etude de la cinétique d'élimination des bactériophages dans les boues liquides de STEU en laboratoire pour définir des conditions de stockage pour obtenir 3 unités logarithmiques d'abattement.
- B. Etudes de l'abattement moyen en bactériophages au cours des processus de stockage des boues in situ.

Les deux études peuvent être conduites en parallèle.

Etude SARS-CoV-2 de manière indirecte.

La proposition est de s'aligner sur les recommandations de l'ANSES et d'étudier les bactériophages : bactériophages ARN F spécifiques et coliphages somatiques qui présentent des profils de résistances au pH et thermiques différentes. L'analyse de ces deux types de bactériophages permettra d'obtenir des résultats plus robustes. Ces bactériophages présentent des durées de survie reconnues comme supérieures à celles des virus enveloppés et donc *a priori* le SARS-CoV-2. L'étude reposera donc sur un scénario du pire cas.

Il est rappelé que cette étude ne permettra pas d'estimer le titre viral SARS-CoV-2 dans les boues avant et après processus de stockage qui impliquerait des approches PCR complexes à mettre en œuvre et qui en plus ne permettrait pas de suivre le caractère infectieux du virus.

**A. Etude de la cinétique d'élimination des bactériophages dans les boues liquides de STEU en laboratoire**

Pour répondre aux contraintes de cette étude, une approche chronologique, illustrée dans la figure ci-dessous, sera mise en œuvre pour évaluer la cinétique de l'abattement des bactériophages, et disposer des résultats au fur et à mesure.

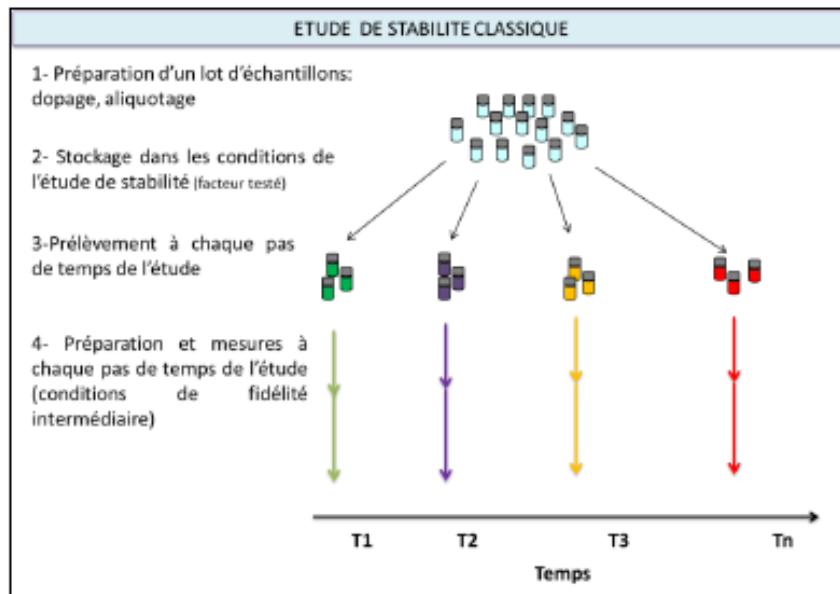


Illustration schématique de l'étude de stabilité chronologique

**Protocole général d'étude de la cinétique d'abattement :**

Ce travail est basé sur des travaux réalisés par AQUAREF<sup>1</sup> et repris dans le projet de norme ISO/TD 5667 :25.

De manière générale, il est recommandé :

- 1) Séparation du lot de boue brute en batches selon le nombre de conditions testées et le nombre de pas de temps de l'étude.

On évite généralement de revenir prélever dans le même flacon pour ne pas engendrer de biais.

Afin de rationaliser le nombre de flacons à préparer, il est proposé de réaliser les analyses de répliqués au sein d'un même flacon.

A minima un nombre de 20-21 batches (flacons) doit être préparé.

<sup>1</sup> Sophie Lardy-Fontan et Béatrice Lalere – Lignes directrices pour la conduite et la validation d'études de stabilité des paramètres physico-chimiques dans le domaine de l'eau – Rapport AQUAREF 2006 –45 p.



2) A J0 :

- Caractérisation de la teneur virale en bactériophages ARN F-spécifiques et en coliphages somatiques.
- Caractérisation de l'homogénéité (intra et inter batch) de l'échantillon indispensable pour pouvoir interpréter les résultats des études cinétiques. Le nombre de répétitions nécessaire à la caractérisation de l'homogénéité dépend des performances de la méthode.

⇒ 3 flacons sélectionnés aléatoirement avec 3 prises d'essai par flacons. Soit un nombre total de 9 mesures pour chaque type de phages.

- Caractérisation d'un lot de boue brute en matière sèche.

⇒ 1 détermination par flacon soit 3 analyses

- 3) Placer les différents flacons de boue dans les différentes conditions de températures (2). Idéalement la température doit être testée entre les bornes suivantes : température minimale et température maximale observées dans les silos de stockage au cours d'une année sur les STEU de 2000 équivalent habitants.

Proposition: 5°C et 20°C

La température dans les enceintes de stockage doit être suivie tout au long de l'étude

4) Durée de l'étude et pas de temps

Etude sur 3 mois.

Pas de temps : J7, J14, J21, J28, J42, J57 et J72.

5) Approche chronologique : analyse à chaque pas de temps de l'étude

Sélectionner de manière aléatoire un flacon dans chaque condition de l'étude (température) et réaliser une analyse en triplicats pour chaque type de phages, et les matières sèches

Pour un pas de temps : 6 analyses par type de phage et matières sèches

Que ce soit à J0 et pour tous les pas de temps de l'étude, il convient d'homogénéiser le flacon avant de procéder à toute prise d'essai.

Le nombre et la fréquence des QC devront être adaptés afin de garantir la qualité des données et les performances des méthodes sur l'ensemble de l'étude.

	18/05/20	Prélèvement de 20 L de boues liquides – STEU de Reims (470 000 EH)	
J0	19/05/20	Réception des 20L de boues liquides Homogénéisation et répartition des boues liquides dans 20 flacons 3 flacons, 3 prises d'échantillon par flacon pour analyses	
		Condition de température : 5°C	Condition de température : 20°C
J7	26/05/20	1 flacon, 3 prises d'échantillon pour analyses	1 flacon, 3 prises d'échantillon pour analyses
J14	02/06/20	1 flacon, 3 prises d'échantillon pour analyses	1 flacon, 3 prises d'échantillon pour analyses
J21	09/06/20	1 flacon, 3 prises d'échantillon pour analyses	1 flacon, 3 prises d'échantillon pour analyses
J28	16/06/20	1 flacon, 3 prises d'échantillon pour analyses	1 flacon, 3 prises d'échantillon pour analyses
J42	30/06/20	1 flacon, 3 prises d'échantillon pour analyses	1 flacon, 3 prises d'échantillon pour analyses
J57	15/07/20	1 flacon, 3 prises d'échantillon pour analyses	1 flacon, 3 prises d'échantillon pour analyses
J72	11/08/20	1 flacon, 3 prises d'échantillon pour analyses	1 flacon, 3 prises d'échantillon pour analyses

#### Méthodes d'analyses :

Les analyses à réaliser concerneront à la fois les bactériophages ARN-F spécifiques et les coliphages somatiques.

Les méthodes de détection et dénombrement devront reposer sur les principes des normes NF EN ISO 10705-1<sup>2</sup> pour les bactériophages à ARN spécifiques et NF EN ISO 10705-2<sup>3</sup> pour les coliphages somatiques.

La méthode de préparation des échantillons de boues avant analyse est critique. En effet, les méthodes de préparation classiquement mises en œuvre pour l'analyse des enterovirus (paramètres réglementés dans les boues) ne sont pas adaptées. Il est recommandé de suivre le protocole D2 4.5 HOR-HYG développé dans le cadre du projet HORIZONTAL-HYG : Horizontal Standards on Hygienic Microbiological parameters for Implementation of EU Directives on Sludge, Soil and Treated Biowastes.

La prise d'essai devra être fixée en amont de l'étude. En règle générale, il est recommandé 25 g de boue.

La détermination de matière sèche devra être basée sur les principes de la NF EN 12880 :2000<sup>4</sup> ou équivalent. Le taux de matière sèche sera aussi systématiquement déterminé pour chaque échantillon de boue à chaque pas de temps.

#### QA/QC

Afin de fiabiliser les données de l'étude, des contrôles qualité seront associés à chaque analyse selon les recommandations des normes en vigueur. A minima : 1 témoin positif et 1 témoin négatif pour bactériophages ARN F-spécifiques et coliphages somatiques.

<sup>2</sup> NF EN ISO 10705-1 Qualité de l'eau Détection et dénombrement des bactériophages Partie 1 : Dénombrement des bactériophages ARN F spécifiques

<sup>3</sup> NF EN ISO 10705-2 Qualité de l'eau - Détection et dénombrement des bactériophages - Partie 2 : dénombrement des coliphages somatiques

<sup>4</sup> NF EN 12880 Caractérisation des boues - Détermination de la teneur en matière sèche et de la teneur en eau

Le LNE prépare un tableau de restitution des résultats de mesure unique afin d'harmoniser les modes de rendus des résultats et le traitement des données de l'étude.

Le laboratoire devra fournir pour chaque série d'analyses les résultats de ses contrôles qualité. Les résultats seront restitués avec leur incertitude élargie ( $k=2$ ). Le laboratoire s'engage à fournir au travers d'un document synthétique les principaux éléments de la validation de méthode. Les performances des méthodes d'analyse bactériophages ARN F spécifiques et coliphages somatiques (adaptées ou non de ces normes) devront être connues avant le début de l'étude : limite de quantification, répétabilité, fidélité intermédiaire à minima. Ces dernières devraient être déterminées en suivant les principes de la norme 10705 :3<sup>5</sup>.

#### Traitements des données

##### Etude de la cinétique d'élimination des bactériophages dans des conditions spécifiées mais représentatives de conditions réelles.

Outil : Droite de tendance

L'extrapolation au-delà de la durée testée ne pourra pas être réalisée. Il est donc nécessaire de bien définir la durée maximale de l'étude pour couvrir l'ensemble des situations. De la même manière l'interpolation entre 2 bornes d'un pas de temps n'est pas autorisée.

##### Etude de facteurs d'influence : Température et temps

Outil : Selon la qualité du jeu de données :

Tests paramétriques ANOVA et test Dunnett

Tests non paramétriques Kruskal Wallis et boîtes à encoche

##### Etude d'estimation de la perte du titre viral au cours du stockage :

Calcul:  $\log_{10}(C0/C) > 3$

C0 : concentration initiale en bactériophage / g de matières sèches

C : concentration après la durée de stockage / g de matières sèches

---

<sup>5</sup> NF EN ISO 10705-3 Qualité de l'eau - Détection et dénombrement des bactériophages - Partie 3 : validation des méthodes de concentration des bactériophages dans l'eau

**B. Etude de l'abattement des bactériophages dans les boues de STEU de 2000 EH environ**

Une étude complémentaire sur site pourrait être réalisée en analysant les bactériophages ARN F spécifiques et les coliphages somatiques, ainsi que le taux de matière sèche, sur les boues avant stockage (J0) et après stockage (X Semaines) sur une sélection représentative des types de STEU de 2000 EH environ, avec participation des collectivités concernées.

Ceci permettrait d'acquérir des données en conditions réelles sur les petites stations.

**Sélection des stations**

D'après des études en cours (France expérimentation) et protocoles normatifs ou de références, un nombre minimal de 30 - 50 stations serait à intégrer.

La sélection des stations sera réalisée conjointement par la FP2E et la FNCCR qui solliciteront les exploitants de stations pour participer à cette étude sur la base du volontariat.

Les critères à considérer pour la sélection des STEU :

- Nombre Equivalents habitants (majoritairement compris entre 1500 et 5000, avec quelques stations plus grandes)
- Localisation géographique (répartition si possible sur le territoire national)
- Type de stockage des boues (silos, bâches, bassins ou autres. etc.)

Idéalement, la sélection des stations participantes doit être la plus représentative possible des différentes situations et contextes de stockage des boues liquides existants sur le territoire national. Notamment, si la grande majorité des stations utilisent des silos pour le stockage des boues liquides, alors ce type de stockage doit être prépondérant parmi les stations sélectionnées. Il est aussi nécessaire, autant que cela est possible, de sélectionner des stations utilisant d'autres modes de stockage, même si de manière minoritaire (3 minimum par type de stockage), afin d'obtenir un panel large de tous les modes de stockage (par exemple stockage non aéré de boues liquides, filtre planté de roseaux, boues chaulées, digestion anaérobie mésophile, Serre solaire ou avec plancher chauffant, etc.).

39 stations ont été sélectionnées (liste du 13 mai 2020), avec la répartition suivante selon le type de stockage :

Type de stockage	Nombre de stations
Stockage non aéré de boues liquides	10
Boues chaulées	
- Filtre presse	5
- Post chaulage	5
Filtre planté de roseaux	
rhizofiltration	3
- rhizocompostage	6
Serre solaire	4
Serre avec plancher chauffant	3
Digestion anaérobie mésophile	3

### Prélèvements et analyses

Les prélèvements des boues brutes et des boues après stockage seront réalisés par les exploitants des stations, conformément aux prescriptions de l'arrêté du 8 janvier 1998 (voir Annexe). Dans le cas des boues chaulées, des prélèvements de boues stockées à 2-3 semaines et à 3 mois seront réalisées.

Les analyses de bactériophages ARN F-spécifiques, coliphages somatiques et de matière sèche seront à la charge des exploitants des stations.

Le nom de la station, la date de prélèvement et le type de boues échantillonnées (boues brutes, boues après stockage, boues chaulées) devront être précisés avec tout envoi d'échantillons au laboratoire. Le LNE propose de préparer avec le laboratoire retenu un formulaire d'envoi d'échantillon (à joindre dans la glacière et à envoyer par email au laboratoire).

Afin de limiter les effets laboratoire, et aussi facilité l'exploitation des données, les analyses de bactériophages ARN F-spécifiques, coliphages somatiques et de matière sèche seront réalisées par un laboratoire unique. Le laboratoire mettra en œuvre les mêmes méthodes et QA/QC que ceux spécifiés dans le protocole A.

Le code projet commun PHAGESBOUES sera à inclure lors de la commande par les collectivités et les exploitants afin de garantir la collecte de l'ensemble des données auprès du laboratoire.

Le laboratoire sélectionné aura la charge d'envoyer des flacons stérilisés et de gérer le transport en conditions réfrigérées ( $5^{\circ} \pm 3^{\circ}\text{C}$ ) des échantillons prélevés.

Le laboratoire doit effectuer un contrôle des échantillons à réception lors de l'enregistrement. Ce contrôle porte sur l'intégrité des échantillons, la conformité de l'identification, du nombre de flacons, du délai entre l'échantillonnage et la réception et de la température de l'enceinte frigorifique ( $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ ). Ce contrôle doit être enregistré. En cas de non-respect du délai entre échantillonnage et analyse (maximum 96 heures) et/ou de la température de l'enceinte (supérieure à  $8^{\circ}\text{C}$  ou inférieure à  $2^{\circ}\text{C}$ ), le laboratoire avertira le LNE et le demandeur qui pourront ne pas admettre les échantillons.

Le LNE prépare un tableau de restitution des résultats de mesure unique afin d'harmoniser les modes de rendus des résultats et le traitement des données de l'étude.

Le laboratoire devra fournir pour chaque série d'analyses les résultats de ses contrôles qualité. Les résultats seront restitués avec leur incertitude élargie ( $k=2$ ). Le laboratoire s'engage à fournir au travers d'un document synthétique les principaux éléments de la validation de méthode : limite de quantification, répétabilité, fidélité intermédiaire, justesse, incertitudes.

Par ailleurs, les conditions de stockage de chaque station participante devront être décrites (stockage non aéré de boues liquides, filtre planté de roseaux, boues chaulées, digestion anaérobie mésophile, serre solaire ou avec plancher chauffant, etc.), ainsi que l'historique du stockage devra être fourni, notamment les volumes ajoutés et dates d'apports de boues liquides dans le temps. Pour cela, le LNE prépare un formulaire à envoyer à chaque station participante sur les conditions et l'historique du stockage et les informations sont collectées par la FP2E et la FNCCR.



Etude d'estimation de la perte du titre viral au cours du stockage :

Calcul:  $\text{Log}_{10}(C0/C) > 3$

C0 : concentration initiale en bactériophage / g de matières sèches

C : concentration après la durée de stockage / g de matières sèches

## Annexe – Protocoles de prélèvement des boues selon l'arrêté du 8 janvier 1998

### 2. Echantillonnage des boues

Les boues font l'objet d'un échantillonnage représentatif. Les sacs ou récipients destinés à l'emballage final des échantillons doivent être inertes vis-à-vis des boues, résistants à l'humidité et étanches à l'eau et à la poussière.

#### 2.1. Boues liquides

Celles-ci doivent être homogénéisées avant prélèvement, soit par recirculation, soit par agitation mécanique pendant une durée comprise entre trente minutes et deux heures selon leur état. Les échantillons représentatifs des boues soumis à l'analyse sont constitués de quatre séries de 5 prélèvements élémentaires de deux litres, à des hauteurs différentes et en des points différents. Les différents prélèvements élémentaires sont mélangés, homogénéisés et réduits à un échantillon global d'un volume minimum de deux litres.

#### 2.2. Boues solides ou pâteuses

Deux options sont possibles :

- échantillonnage sur un lot : Les échantillons représentatifs des boues soumis à l'analyse sont constitués de 25 prélèvements élémentaires uniformément répartis en différents points et différentes profondeurs du lot de boues destinées à être épandues. Les prélèvements sont effectués à l'aide d'une sonde en dehors de la croûte de surface et des zones où une accumulation d'eau s'est produite. Les prélèvements élémentaires sont mélangés dans un récipient ou sur une bâche et donnent, après réduction, un échantillon d'un kilogramme environ envoyé au laboratoire ;

- échantillonnage en continu : Les échantillons représentatifs des boues soumis à l'analyse sont constitués de 25 prélèvements élémentaires régulièrement espacés au cours de la période séparant chaque envoi au laboratoire. Chaque prélèvement élémentaire doit contenir au moins 50 grammes de matière sèche, et tous doivent être identiques. Ces échantillons élémentaires sont conservés dans des conditions ne modifiant pas leur composition, puis rassemblés dans un récipient sec, propre et inerte afin de les homogénéiser de façon efficace à l'aide d'un outil adéquat pour constituer un échantillon composite qui, après réduction éventuelle, est envoyé au laboratoire.

L'échantillon pour laboratoire représente 500 grammes à un kilogramme de matière sèche.

**ANNEXE 4**

**CAPACITE D'EVALUATION INDIRECTE POUR LE SARS-CoV-2 DANS LE SMATRICES RESIDUAIRES : SUIVI DES BACTERIOPHAGES SELON LA NORME NF EN ISO 10 705**

(Anses, 2020d) Non publié

(22 réponses)		Matrices	Bactériophages		Accréditation
OUI	7	Eaux propres et eaux résiduaires	ARN-f	7	3
			Somatiques	5	0
		Boues ou matrices similaires	ARN-f	4	0
			Somatiques	3	
NON	15				

Concernant la quantification de bactériophages à partir d'échantillons résiduaires, les bactériophages ARN-F spécifiques disposent de la plus grande capacité analytique avec 7 laboratoires qui déclarent être en capacité de réaliser cette analyse sur les eaux résiduaires, contre 5 laboratoires pour la quantification de coliphages somatiques. Pour la matrice eaux résiduaires, 3 laboratoires sont accrédités et uniquement pour le paramètre bactériophages ARN-F spécifiques. Dans les boues et matrices similaires la capacité analytique est réduite à environ la moitié de la capacité sur eaux résiduaires avec respectivement 4 et 3 laboratoires pouvant pratiquer l'analyse pour les bactériophages ARN-F spécifiques et pour les coliphages somatiques. Aucun laboratoire n'est accrédité pour la détection des bactériophages dans les boues.