

Institut de Recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail

**PhareSST**

---

Microbiologiques

Méthodes de laboratoire

---

2013

## Détection et identification des bactéries du genre *Legionella*

Brassard Nicole

Suivez ce contenu et d'autres travaux à l'adresse suivante: <https://pharesst.irsst.qc.ca/microbiologiques>

---

### Citation recommandée

Brassard, N., Marchand, G., Pépin, C. et Lacombe, N. (2015). *Détection et identification des bactéries du genre Legionella* (Méthode analytique n° MA-370). IRSST.

Ce document vous est proposé en libre accès et gratuitement par PhareSST. Il a été accepté pour inclusion dans Microbiologiques par un administrateur autorisé de PhareSST. Pour plus d'informations, veuillez contacter [pharesst@irsst.qc.ca](mailto:pharesst@irsst.qc.ca).

# M

## Méthodes de laboratoire

### Détection et identification des bactéries du genre *Legionella*

MÉTHODE ANALYTIQUE 370



#### Applicabilité

Cette méthode est utilisée pour faire la détection et l'identification des bactéries du genre *Legionella* dans des échantillons d'eau

#### Norme(s)<sup>1</sup>

Aucune norme

#### Système d'échantillonnage

Bouteille stérile de 1 litre (1 L) avec thiosulfate

#### Volume d'échantillonnage recommandé

1 L dans une bouteille stérile avec thiosulfate

#### Analyse

Croissance sur milieux gélosés BCYE, examen par stéréomicroscopie à fibre optique, microscopie à la lumière transmise, chromatographie en phase gazeuse et test d'agglutination

#### Valeur minimale rapportée (VMR)

- Eaux de procédé : 3000 UFC/L
- Plus élevée si des dilutions sont nécessaires (c.-à-d. présence de bactéries hétérotrophes interférentes ou envahissantes)
- Eaux de consommation : 10 UCF/L pour 10 mL filtrés
- Selon le volume filtrable de l'échantillon

#### Domaine d'application

Selon les dilutions : 1 à 300 colonies par gélose

#### Fidélité

- Répétabilité : 3,5 % méthode étalement, 6 % méthode filtration
- Reproductibilité : 5 % méthode étalement, 7 % méthode filtration
- Spécificité identification : 100 % *Legionella* au genre et *L. pneumophila*

#### Incertitude analytique (CV<sub>A</sub>)

N.A.

Lorsque imprimé, ce document est non contrôlé.  
SVP vous référer au document disponible sur support informatique.

No. Révision: 3 - Date de diffusion: 2015-07-07





Solidement implanté au Québec depuis 1980, l'Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail (IRSST) est un organisme de recherche scientifique reconnu internationalement pour la qualité de ses travaux.

## NOS RECHERCHES *travaillent pour vous !*

### Mission

Contribuer, par la recherche, à la prévention des accidents du travail et des maladies professionnelles ainsi qu'à la réadaptation des travailleurs qui en sont victimes;

Assurer la diffusion des connaissances et jouer un rôle de référence scientifique et d'expertise;

Offrir les services de laboratoires et l'expertise nécessaires à l'action du réseau public de prévention en santé et en sécurité du travail.

*Doté d'un conseil d'administration paritaire où siègent en nombre égal des représentants des employeurs et des travailleurs, l'IRSST est financé par la Commission de la santé et de la sécurité du travail.*

### Pour en savoir plus

Visitez notre site Web ! Vous y trouverez une information complète et à jour. De plus, toutes les publications éditées par l'IRSST peuvent être téléchargées gratuitement. [www.irsst.qc.ca](http://www.irsst.qc.ca)

Pour connaître l'actualité de la recherche menée ou financée par l'IRSST, abonnez-vous gratuitement au magazine Prévention au travail, publié conjointement par l'Institut et la CSST. Abonnement : [www.csst.qc.ca/AbonnementPAT](http://www.csst.qc.ca/AbonnementPAT)

### Dépôt légal

Bibliothèque et Archives nationales du Québec  
2015  
ISBN : 978-2-89631-753-0 (PDF)  
ISSN : 0820-8395

IRSST - Direction des communications  
et de la valorisation de la recherche  
505, boul. De Maisonneuve Ouest  
Montréal (Québec) H3A 3C2  
Téléphone : 514 288-1551  
Télécopieur : 514 288-7636  
[publications@irsst.qc.ca](mailto:publications@irsst.qc.ca)  
[www.irsst.qc.ca](http://www.irsst.qc.ca)

© Institut de recherche Robert-Sauvé  
en santé et en sécurité du travail,  
2015

IRSST – Direction des laboratoires (12<sup>e</sup> étage)  
505, boul. De Maisonneuve Ouest  
Montréal (Québec) H3A 3C2  
[sac.labo@irsst.qc.ca](mailto:sac.labo@irsst.qc.ca)

Lorsque imprimé, ce document est non contrôlé.  
SVP vous référer au document disponible sur support informatique.

No. Révision: 3 - Date de diffusion: 2015-07-07

# Méthodes de laboratoire

## Détection et identification des bactéries du genre *Legionella*

MÉTHODE ANALYTIQUE 370

### Avis de non-responsabilité

Les méthodes d'analyse ou d'étalonnage sont conçues ou ont été retenues par l'IRSST pour l'exécution de divers travaux dans le cadre de mandats qu'on lui confie. Elles peuvent nécessiter des opérations délicates ou requérir l'utilisation de matériels ou d'équipements dangereux. Des risques pour la santé et la sécurité des personnes peuvent être associés à leur utilisation. Ces méthodes sont fournies « telles quelles » sans aucune garantie de quelque nature que ce soit relative aux erreurs ou aux dommages qui découleraient de leur utilisation et de leur application. Le présent avis de non-responsabilité n'entend pas contrevenir aux dispositions de législations canadiennes applicables en cette matière, qu'il s'agisse des lois fédérales, provinciales ou territoriales en vigueur au Canada.

Les hyperliens qui apparaissent dans ce document ont été validés au moment de la publication.

### Responsable technique de la méthode

**Nicole Brassard**, microbiologiste, M.Sc.,  
Direction des laboratoires - IRSST

### Personnes ayant contribué à la version de cette méthode

**Geneviève Marchand**, microbiologiste, Ph.D.,  
Prévention des risques chimiques et biologiques – IRSST

**Carole Pépin**, technicienne de laboratoire,  
Direction des laboratoires – IRSST

**Nancy Lacombe**, technicienne de laboratoire,  
Direction des laboratoires - IRSST



Cette publication est disponible  
en version PDF  
sur le site Web de l'IRSST.

[http://www.irsst.qc.ca/fr/methodes\\_par\\_type.html](http://www.irsst.qc.ca/fr/methodes_par_type.html)

Ce document technique a été financé par l'IRSST et préparé par la Direction des laboratoires.

Lorsque imprimé, ce document est non contrôlé.  
SVP vous référer au document disponible sur support informatique.

No. Révision: 3 - Date de diffusion: 2015-07-07

**IRSST**

Lorsque imprimé, ce document est non contrôlé.  
SVP vous référer au document disponible sur support informatique.

No. Révision: 3 - Date de diffusion: 2015-07-07

## TABLE DES MATIÈRES

	Page
Préambule.....	1
1. Principe de la méthode.....	2
2. Interférences.....	2
3. Matériel.....	3
4. Réactifs.....	3
5. Échantillonnage.....	3
6. Protocole analytique.....	4
6.1 Préparation des solutions.....	4
6.1.1 Eau de dilution.....	4
6.1.2 Tampon acide (HCL).....	4
6.1.3 Solution de rinçage.....	5
6.2 Préparation des contrôles d'analyse.....	5
6.2.1 Contrôle positif.....	5
6.2.2 Contrôle négatif.....	6
6.3 Préparation des échantillons.....	6
6.3.1 Échantillons de procédé (ex. : tour de refroidissement, bassin, etc.).....	6
6.3.2 Échantillons de consommation (ex. : douche, buvettes).....	6
6.3.3 Incubation des échantillons.....	7
6.4 Analyse quantitative.....	7
6.5 Analyse qualitative.....	8
6.6 Calcul des résultats.....	8
7. Paramètres d'application.....	9
7.1 Limite de détection et limite de quantification.....	9
8. Fidélité.....	9
8.1 Spécificité de la méthode d'identification.....	9
9. Exactitude.....	9
9.1 Méthode d'analyse par étalement et dilution.....	9
9.2 Méthode d'analyse par filtration.....	10

10. Contrôle de qualité .....	10
10.1 Contrôle interlaboratoire	10
10.2 Contrôle intra et intertechniciens	10
10.3 Contrôle des produits utilisés	10
10.4 Contrôle suivi des manipulations:	10
11. Santé et sécurité.....	11
11.1 Déversement mineur	11
11.2 Déversement majeur : Le port d'un masque N-95 est nécessaire	11
12. Bibliographie.....	12
Annexe 1 : .....	13
Annexe 2 : .....	14

## Préambule

La Loi sur la santé et la sécurité du travail au Québec a comme objet l'élimination à la source des dangers pour la santé, la sécurité et l'intégrité physique des travailleurs. Des valeurs d'exposition admissibles (VEA) aux substances chimiques ont été fixées à l'annexe 1 du Règlement sur la santé et la sécurité du travail (RSST). L'article 44 de ce règlement intitulé « Méthodes » spécifie que :

*« ... Ces gaz, ces fumées, ces vapeurs, ces poussières et ces brouillards présents dans le milieu de travail doivent être prélevés et analysés de manière à obtenir une précision équivalente à celle obtenue en appliquant les méthodes décrites dans le Guide d'échantillonnage des contaminants de l'air en milieu de travail publié par l'Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail ... »*

Pour atteindre ces objectifs, des méthodes d'analyse visant à quantifier le degré d'exposition des travailleurs sont développées et rédigées pour implanter les moyens de contrôle adéquats. Afin d'assister les intervenants en milieu de travail, l'IRSST publie, révisé périodiquement et diffuse le *Guide d'échantillonnage des contaminants de l'air en milieu de travail* et la Direction des laboratoires publie des méthodes d'analyses des contaminants.

Par ailleurs, toute la terminologie utilisée dans cette méthode est décrite dans l'instruction de travail « I-G-014 » du système de gestion documentaire associée au système qualité de l'IRSST.

## 1. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Cette méthode permet de faire la détection et l'identification des bactéries du genre *Legionella* qui peuvent être retrouvées dans différents environnements liquides (p. ex. : eau des tours de refroidissement, humidificateurs, douches).

Il s'agit d'une méthode par croissance obtenue par un étalement sur une gélose BCYE (pouvant contenir le supplément BMPA) après dilution ou concentration par filtration. Les échantillons peuvent ou non être traités à la chaleur afin de réduire le nombre de bactéries hétérotrophes présentes dans l'échantillon.

## 2. INTERFÉRENCES

La sensibilité de cette méthode varie selon :

- La capacité de reconnaître les colonies caractéristiques des *Legionella*.
- La capacité d'obtenir une culture pure de chaque type de colonie caractéristique de la *Legionella* qui est nécessaire pour la confirmation.
- La rencontre des conditions de croissance qui favorise le développement des *Legionella*.
- Les conditions lors du transport qui peuvent modifier la flore de l'échantillon. Des bactéries hétérotrophes peuvent croître et interférer avec la détection de *Legionella* et cette dernière peut perdre sa capacité de croissance. Les échantillons doivent être conservés entre 6 et 20 °C.
- La présence de chlore ou de biocides en concentration élevée lors du prélèvement d'eau peut inhiber la croissance de *Legionella* en laboratoire et entraîner une sous-estimation.
- La fréquence d'ajout des produits de traitement de l'eau. Si celle-ci est inférieure à 48 heures, il faut prélever l'échantillon juste avant le prochain ajout de produit traitant.
- La population de bactéries hétérotrophes présente dans l'échantillon qui peut interférer avec la croissance des bactéries du genre *Legionella*. Ex. : La présence de la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* inhibe la croissance des *Legionella* sur gélose. Une remarque est enregistrée sur le rapport d'analyse lorsque des bactéries hétérotrophes en grande concentration sont observées.
- La présence de microorganismes envahissants se développant sur la gélose qui peuvent rendre la détection, le dénombrement et l'isolement des *Legionella* difficiles, voire impossibles. Une remarque doit être enregistrée dans le rapport d'analyse lorsque des bactéries envahissantes interfèrent avec l'analyse.
- Le traitement à la chaleur qui peut diminuer la capacité de croître des *Legionella*. Une remarque de possible sous-estimation de la concentration de *Legionella* doit être enregistrée dans le rapport d'analyse lorsque le traitement à la chaleur est utilisé.
- La sélectivité de la méthode dépend des espèces de *Legionella* qui peuvent être confirmées par les méthodes d'identification *Instant FAME* de la compagnie MIDI inc. ® et les tests d'agglutination de la compagnie OXOID® (voir en annexe les listes pour chaque méthode).

### 3. MATÉRIEL

- Tige bouclée
- Stéréomicroscope 20 X-120 X
- Source lumineuse à fibre optique
- Chromatographe en phase gazeuse avec colonne capillaire de type ultra 2 (Agilent 19091B-102)
- Base de données Sherlock pour *Instant FAME* (MIDI, Delaware, É.-U.)
- Réfrigérateur à température constante ( $5\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ )
- Incubateur CO<sub>2</sub> ( $35\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ , 2,5 % CO<sub>2</sub>)
- Hotte à flux laminaire
- Hotte chimique
- Filtres noirs de nitrocellulose (Milipore), porosité de 0,45 µm, dimension de 47 mm
- Système de filtration sous vide
- Bain-marie ( $50\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ )
- Bâtons d'étalement ou système automatisé pour l'étalement (Easy Spiral dilute)
- Micropipettes
- Embouts stériles
- Tubes stériles
- Vortex
- Vial GC
- Balance
- Autoclave
- Lampe U.V. à 365 nm

### 4. RÉACTIFS

- Géloses BCYE
- Supplément BMPA (Cefamandole 4,0 mg, Polymyxin B, 80 000 IU Anisomycin 80 mg par litre de milieu)
- Gélose TSA-sang ou TSA
- Tampon acide (HCL)
- Tampon phosphate stérile (eau de dilution et de rinçage)
- Tests d'agglutination Oxoid® (*Legionella pneumophila* séro groupe 1; 2-14 et *Legionella* sp)
- Huile à immersion
- Réactifs d'extraction *Instant FAME*

### 5. ÉCHANTILLONNAGE

Les échantillons doivent être prélevés dans un contenant stérile. Si le liquide prélevé contient du chlore ou du bromure ou tout autre biocide, du thiosulfate doit être présent dans le contenant (concentration finale de 200 mg/L). En principe, 180 mg de sodium thiosulfate pentahydraté va neutraliser 1 L d'eau contenant jusqu'à 50 mg de chlore. Dans le cas d'un prélèvement effectué à la suite d'un traitement-choc, il est nécessaire d'attendre un minimum de 48 heures entre le traitement et la prise de l'échantillon. Dans certains cas, et ce, afin de réduire la contamination périphérique, il peut être nécessaire de faire couler l'eau de

2 à 3 minutes avant d'effectuer le prélèvement si celui-ci est fait à partir d'une valve. Pour les tours de refroidissement à l'eau (TRE), il est important que l'échantillon soit représentatif de l'eau de la tour et non pas de l'eau d'appoint ou des dépôts présents dans le robinet de la purge. Le préleveur doit connaître le fonctionnement de la tour pour assurer un prélèvement représentatif.

Il n'est pas nécessaire de fournir un témoin.

Pour plus d'information sur le prélèvement des tours de refroidissement à l'eau, il est utile de consulter le document intitulé *Protocole d'échantillonnage de l'eau du circuit des tours de refroidissement pour la recherche des légionelles, DR-09-11*, publié par le Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec (CEAEQ). Pour le prélèvement de tout autre type d'eau, il peut être utile de consulter les guides comme celui de *l'Environment Agency* de l'Angleterre intitulé *The determination of Legionella bacteria in water and other environmental samples-part 1 Rationale of Surveying and Sampling-Methods for the Examination of Waters and Associated Materials* et la norme française AFNOR FD T 90-522 (2006) intitulée Guide technique de prélèvement pour la recherche de *Legionella* dans les eaux.

Le transport au laboratoire doit se faire dans les plus brefs délais. Ne jamais dépasser 48 heures. Il est préférable de laisser refroidir les échantillons à la température de la pièce et de les protéger du gel et des températures extrêmes. Conserver entre 6 °C et 20 °C durant le transport. Les refroidisseurs sont nécessaires seulement l'été. Une note sera inscrite si l'échantillon ne peut arriver en moins de 48 heures. Dans un tel cas, les résultats peuvent ne plus être représentatifs de l'échantillon lors du prélèvement (sous ou surestimation).

## 6. PROTOCOLE ANALYTIQUE

### 6.1 Préparation des solutions

#### 6.1.1 Eau de dilution

Préparer le tampon phosphate 1 X en effectuant les dilutions nécessaires selon les recommandations du fabricant.

#### 6.1.2 Tampon acide (HCL)

Préparer une solution d'acide chlorhydrique (HCl) à 0,2 mol/L (Solution A) :

- Ajouter 17,4 mL de HCl concentré ( $\rho = 1,18$ , teneur minimale 35,4 %) ou 20 mL de HCl ( $\rho = 1,16$ , teneur minimale 31,5 %) à 1 L d'eau distillée.
- Stériliser à l'autoclave à  $(121 \pm 3 \text{ °C})$  pendant  $(15 \pm 1 \text{ min})$ .

Préparer une solution de chlorure de potassium (KCl) à 0,2 mol/L (Solution B) :

- Dissoudre 14,9 g de KCl dans 1 L d'eau distillée.
- Stériliser à l'autoclave à  $(12 \pm 3 \text{ °C})$  pendant  $(15 \pm 1 \text{ min})$ .
- Mélanger 3,9 mL de la Solution A et 25 mL de la Solution B.
- Ajuster le pH à  $2,2 \pm 0,2$  en ajoutant une solution d'hydroxyde de potassium (KOH) à 1 mol/L.

Lorsque imprimé, ce document est non contrôlé.  
SVP vous référer au document disponible sur support informatique.

- Conserver dans un récipient en verre bouché, dans l'obscurité et à température ambiante, pendant un mois au maximum.

### 6.1.3 Solution de rinçage

Préparer le tampon phosphate 1 X en effectuant les dilutions nécessaires selon les recommandations du fabricant.

## 6.2 Préparation des contrôles d'analyse

Pour chaque série d'analyses, des contrôles positif et négatif doivent être effectués. Les mêmes étapes prescrites pour les échantillons analysés (traitement à la chaleur, acide et filtration si applicable) doivent être suivies pour la suspension de *Legionella pneumophila* (contrôle positif) et la solution d'eau stérile (contrôle négatif). Note : Les étalements des contrôles se font sur une seule gélose.

### 6.2.1 Contrôle positif

Le contrôle positif se fait par ajout de cellules de *Legionella pneumophila* dans 1 L d'eau saline stérile.

Utiliser une culture de *Legionella pneumophila* ayant entre 3 et 7 jours.

- Les souches isolées d'échantillon terrain démontrent parfois une meilleure récupération aux traitements (chaleur et acide) que la souche ATCC 33155. Il est possible d'utiliser une telle souche si l'identification et la résistance aux traitements sont démontrées.

Préparer 2 mL d'une suspension bactérienne, à partir d'une colonie d'une culture de 3 à 5 jours de *Legionella pneumophila* sur gélose.

- La densité ainsi obtenue permet d'obtenir des colonies isolées sur les géloses contrôles positives avec et sans traitement (chaleur, acide).
- Les bactéries du contrôle positif doivent être prises dans le 3<sup>e</sup> ou 4<sup>e</sup> quadrant. Il est important de ne pas prélever où il y a confluence de colonies, car l'estimation de la concentration de cellules cultivables y est plus difficile. L'utilisation de colonies isolées permet une meilleure estimation de la concentration finale inoculée sur gélose.

Prendre 1 mL de cette suspension et l'ajouter à 1 L d'eau stérile.

Bien agiter pour homogénéiser.

Le contrôle positif doit subir les mêmes traitements que les échantillons.

Faire l'étalement ou la filtration, selon les analyses effectuées, de 100 µL sur les géloses BCYE du contrôle positif non traité ainsi que pour chaque traitement. Les contrôles ne sont pas étalés en triplicata.

### 6.2.2 Contrôle négatif

Le contrôle négatif est l'étalement ou la filtration d'eau stérile.

## 6.3 Préparation des échantillons

### 6.3.1 Échantillons de procédé (ex. : tour de refroidissement, bassin, etc.)

VMR : 3000 UFC/L pour 100 µL étalés en triplicata

Le traitement à la chaleur est fait sur tous les échantillons d'eaux de procédés.

Le traitement acide ou combiné ne sera fait que pour des besoins particuliers ou des demandes spéciales.

Traitement à la chaleur (sur tous les échantillons)

- Placer environ 25 mL de l'échantillon dans un tube à centrifugation stérile de 50 mL.
- Traiter à la chaleur à  $50 \pm 2$  °C durant une période de  $30 \pm 2$  minutes.
- Continuer les manipulations sur les **deux fractions** de l'échantillon (traité et non traité).
- Étaler 100 µL non dilués des fractions non traitées et traitées à la chaleur en **triplicata** sur gélose BCYE+BMPA.
- Faire une dilution 1/10 des fractions non traitées et traitées avec de l'eau peptonée additionnée à 0,05 % de Tween 20.
- Étaler 100 µL de chaque dilution en **duplicata** sur gélose BCYE+BMPA.

Traitement acide (seulement lorsque nécessaire)

- Mettre 1 mL de l'échantillon dans un tube de 2 mL.
- Ajouter 1 mL de la préparation HCl/KCl acide.
- Laisser en contact durant  $5 \pm 0,5$  minutes.
- Étaler rapidement 200 µL en triplicata sur la gélose BCYE+BMPA.

**Note :** Si 100 µL est étalé, il faut considérer une dilution  $\frac{1}{2}$  pour ce traitement lors du calcul des concentrations.

### 6.3.2 Échantillons de consommation (ex. : douche, buvettes)

VMR : 10 UFC/L pour 100 mL filtrés

Filtration

- Placer le filtre Millipore noir sur l'entonnoir de filtration.
- Filtrer 10 mL de l'échantillon non traité.
- Rincer l'entonnoir soigneusement avec la solution de rinçage (20 – 30 mL).
- Retirer soigneusement la membrane du support avec une pince stérile et la placer (dessus vers le haut) directement sur la boîte de Petri BCYE + BMPA.
- Répéter pour filtrer 100 mL de l'échantillon non traité.

**Attention** de ne pas assécher le filtre. Arrêter l'aspiration dès que le liquide est entièrement écoulé. Les bactéries *Legionella* ne supportent pas bien l'assèchement, elles peuvent perdre leur capacité de croître si elles sont asséchées.

Lorsque imprimé, ce document est non contrôlé.  
SVP vous référer au document disponible sur support informatique.

### Étalement des échantillons

- Étaler 100 µL non dilués de la fraction non traitée en triplicata sur gélose BCYE + BMPA.

N.B. : Lorsque nécessaire, on peut filtrer en parallèle une fraction de l'échantillon traitée à la chaleur.

### 6.3.3 Incubation des échantillons

- Incuber à  $35 \pm 1$  °C en atmosphère 2,5 % CO<sub>2</sub>.
- La période d'incubation dépend de la charge bactérienne présente dans l'échantillon. Elle ne doit pas être inférieure à trois jours et des résultats négatifs ne peuvent être enregistrés en moins de 10 jours d'incubation.

## 6.4 Analyse quantitative

L'analyse quantitative s'effectue sur l'étalement qui fournira la plus petite VMR tout en permettant de faire le dénombrement, la détection et l'isolement des colonies de *Legionella spp.*

L'analyse de la fraction de l'échantillon traitée à la chaleur est réalisée seulement lorsqu'il y a croissance importante de bactéries hétérotrophes sur la fraction non traitée, car une perte de la capacité de croissance sur la gélose a été démontrée par le traitement à la chaleur. Une remarque sur la sous-estimation de la concentration de *Legionella spp* doit être enregistrée dans le rapport d'analyse.

**Caractéristiques de la colonie de *Legionella spp*** : coloration gris-bleu claire avec aspect de verre fritté à la loupe binoculaire, pouvant aussi être de couleurs variables : jaune, blanc, marron, violet, rose. Les colonies peuvent devenir blanchâtres en vieillissant. Certaines sont fluorescentes sous lampe UV à 365 nm.



- Dénombrer au stéréomicroscope à un grossissement de 60 X avec une source lumineuse à fibre optique chaque type de colonies présentant les caractéristiques macroscopiques des *Legionella*.
- Compter les colonies d'un même type sur toutes les boîtes de Petri.
- Chaque type de colonie doit être isolé en culture pure avant de procéder à la confirmation.

## 6.5 Analyse qualitative

- Isoler chaque type de colonies représentant les caractéristiques phénotypiques de *Legionella spp* sur une gélose BCYE et une gélose TSA-sang, utilisez la même colonie pour inoculer les deux géloses.

**Attention :** Un biais positif vers les types de colonies les plus fréquemment vues par le laboratoire peut se créer avec le temps. Lorsque plusieurs types de colonies non caractéristiques sont présents sur la gélose, un repiquage supplémentaire de deux à trois colonies non ciblées initialement par l'analyste devrait être effectué.

- Incuber le BCYE à  $35 \pm 1$  °C en atmosphère 2,5 % CO<sub>2</sub> et le TSA sang à  $35$  °C  $\pm$  2 °C.
- Si la colonie croît sur le TSA sang, il est essentiel de s'assurer que la même colonie est une culture pure sur BCYE. Une culture mixte de *Legionella* et d'une autre bactérie non fastidieuse pourrait entraîner un faux négatif.
- S'il n'y a pas de croissance sur le TSA-sang, confirmer avec la méthode *Instant FAME* (se référer au protocole de MIDI® inc.).
- Procéder également au test d'agglutination au latex d'Oxoid® :
  - si les résultats ne permettent pas d'identification avec la méthode *Instant FAME*;
  - si les résultats ont un SI inférieur à 0,2 pour *Legionella pneumophila*;
  - si les résultats avec la méthode *Instant FAME* sont autres que *L. pneumophila*;
  - si vous devez connaître le sérotype.

## 6.6 Calcul des résultats

### Si aucune *Legionella* ne peut être confirmée,

Inscrire < à la VMR

Le plus petit résultat possible est d'une colonie sur une seule des trois boîtes de Petri.  
**Attention au volume d'étalement.**

### Pour un résultat positif

- Prendre le nombre de colonies dénombré sur les trois boîtes de Petri.
- Calculer le nombre de colonies par L.
- Ajuster selon la dilution ou la concentration effectuée.

### Exemple :

#### **Pour un étalement de 100 µl sans dilution**

Boîte de Petri : 1 = 3 colonies confirmées, 2 = 5 colonies confirmées, 3 = 0 colonie confirmée.

Concentration dans le volume étalé : Somme des colonies/volume étalé

(L) = (3+5+0)/0,0003L = 26 666 UFC/L donc selon les chiffres significatifs : 27 000 UFC/L.

#### **Pour un étalement et une dilution de 1/10**

Concentration dans l'étalement (UFC/L) \* (inverse de la dilution) =  
 27 000\*(10) = 270 000 UFC/L.

#### **Pour une filtration de 100 mL de l'échantillon**

Pour le F 100 mL deux colonies sont confirmées.

2/0,1 L = 20 UFC/L.

Lorsque imprimé, ce document est non contrôlé.  
 SVP vous référer au document disponible sur support informatique.

## 7. PARAMÈTRES D'APPLICATION

### 7.1 Limite de détection et limite de quantification

**Eaux de procédés** : La limite de détection théorique pour la méthode d'analyse des eaux de procédé est de 3000 UFC/L lorsque l'étalement est de 100 µL sur trois géloses et la détection d'une colonie sur une seule boîte de Petri. La limite de détection est influencée par la présence de bactéries hétérotrophes, qui peuvent entraîner la nécessité de faire des dilutions de l'échantillon et ainsi engendrer des limites de détection plus élevées.

**Eaux de consommation** : La limite de détection théorique pour la méthode d'analyse des eaux de consommation a été calculée à 10 UFC/L en considérant un volume filtré de 100 mL et la détection d'une colonie sur la boîte de Petri. La limite de détection est influencée par la présence de bactéries hétérotrophes et les particules qui peuvent réduire le volume filtré de l'échantillon et ainsi engendrer des limites de détection plus élevées.

La limite de quantification est de 1 à 300 colonies sur une boîte de Petri.

## 8. FIDÉLITÉ

### 8.1 Spécificité de la méthode d'identification

Afin de déterminer la spécificité de l'identification, 23 souches de contrôle ATCC de différentes espèces de *Legionella* ont été identifiées par les deux méthodes d'analyse qualitatives. Ses essais ont permis de déterminer une spécificité de 100 % au genre pour les *Legionella*, une spécificité de 100 % à l'espèce pour les *L. pneumophila* et une spécificité de 70 % pour l'identification des autres espèces de *Legionella*. La difficulté à déterminer la spécificité des autres espèces survient pour les espèces moins courantes de *Legionella* qui ne sont pas incluses dans les bases de données ou non reconnues par les tests d'agglutination. Ces souches seront rapportées comme étant des *Legionella* (voir annexes 1 et 2 pour les listes des différentes espèces pouvant être identifiées).

## 9. EXACTITUDE

Les échantillons d'eau pour la validation ont été produits par ajout dosé de la souche *Legionella pneumophila* ATCC 33152.

### 9.1 Méthode d'analyse par étalement et dilution

La répétabilité pour les échantillons étalés est de 3,5 %. Elle est obtenue par l'analyse de quatre concentrations différentes effectuée à six reprises la même journée. La reproductibilité, obtenue par l'analyse de quatre concentrations différentes par trois analystes est de 5 %.

## 9.2 Méthode d'analyse par filtration

La répétabilité pour les échantillons filtrés est de 6 %. Elle est obtenue par l'analyse de quatre concentrations différentes effectuée à six reprises la même journée. Des volumes de filtration allant jusqu'à 100 ml ont été utilisés pour l'évaluation. La reproductibilité obtenue par l'analyse de quatre concentrations différentes par trois analystes est de 7 %.

## 10. CONTRÔLE DE QUALITÉ

### 10.1 Contrôle interlaboratoire

Un contrôle de qualité interlaboratoire est effectué avec le *Public Health of England* et leur programme FEPTU (*Food and Environmental Proficiency Testing Unit*). Douze échantillons nous sont envoyés chaque année. Chaque série contient deux échantillons contenant ou non de la *Legionella*. Ils nous sont acheminés sous forme de lenticule et une reconstitution en milieu liquide est effectuée par le laboratoire.

### 10.2 Contrôle intra et intertechniciens

Un contrôle de dénombrement est effectué pour calculer la variation des résultats pour chaque analyste ainsi que celle des résultats entre les différents analystes. Pour effectuer ce contrôle, un échantillon est retenu après chaque groupe de vingt dénombrements pour être recompté et faire le calcul de la variation intra et inter analyste.

### 10.3 Contrôle des produits utilisés

Un contrôle de qualité est effectué sur 1 % des géloses lors de leur réception afin de vérifier leur stérilité.

### 10.4 Contrôle suivi des manipulations :

- Un contrôle positif est réalisé avec et sans le traitement effectué.
- Un blanc de filtration est réalisé au début et à la fin de chaque série de filtration.
- Un blanc d'étalement est réalisé à la fin de chaque série d'étalement.
- Lors de chaque série d'analyses avec la méthode *Instant FAME*, un blanc d'extraction (check), un blanc de produits (BLK) ainsi qu'un contrôle positif pour la méthode (*Legionella pneumophila*) sont réalisés.
- Pour les analyses par le test d'agglutination, un contrôle positif est réalisé pour chaque série d'analyses.

## 11. SANTÉ ET SÉCURITÉ

### 11.1 Déversement mineur

Lors d'un petit déversement (quelques boîtes de Petri) de microorganismes, le technicien doit répandre un produit désinfectant (alcool, eau de javel, etc.) sur la surface contaminée. Recouvrir ensuite, puis quitter le laboratoire pendant environ trente minutes pour que les particules se déposent. Mettre une affiche sur la porte interdisant l'accès du laboratoire si nécessaire. Après trente minutes, mettre un masque N-95 avant d'entrer dans le laboratoire, et bien nettoyer la surface contaminée. Il faut traiter à l'autoclave tout le matériel qui a été en contact avec le contaminant.

### 11.2 Déversement majeur : Le port d'un masque N-95 est nécessaire

Lors d'un gros déversement (plusieurs boîtes de Petri), le technicien doit sortir du laboratoire, mettre une affiche sur la porte pour en interdire l'accès, puis aviser le professionnel responsable et son supérieur. Après les 30 minutes d'attente nécessaire pour le dépôt des particules, ne pas oublier de mettre un masque N-95 avant d'entrer dans le laboratoire. Verser un produit désinfectant (alcool, eau de javel) sur la surface contaminée et recouvrir pour laisser agir. Après une trentaine de minutes, bien nettoyer la surface contaminée. Il faut mettre à l'autoclave tout le matériel qui a été en contact avec le contaminant. Selon l'ampleur du déversement, le professionnel responsable pourrait demander que toutes les surfaces (murs, comptoirs, planchers, etc.) ayant possiblement été en contact avec le contaminant soient décontaminées.

## 12. BIBLIOGRAPHIE

- AFNOR, (2003), *Guide technique de prélèvement pour la recherche de Legionella dans les eaux*, FD T 90-431, France, 40 p.
- AFNOR, (2006), *Guide technique de prélèvement pour la recherche de Legionella dans les eaux*, FD T 90-522, France, 17 p.
- ASTM International, (2000), *Standard Guide for Inspecting Water systems for Legionellae and Investigating Possible Outbreaks of Legionellosis (Legionnaire's Disease or Pontiac Fever)*, D592-02, USA, 19 p.
- Clesceri, L.S., Greenberg, A.E. Eaton, A.D., (1998) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20<sup>th</sup> edition, American Public Health Association, American Water Works Association and Water Environment Federation, Washington, USA'
- Environment Agency (National Laboratory Services), *The determination of Legionella bacteria in water and other environmental samples, (2005), - Part 1 - Rationale of surveying and sampling- Methods for the Examination of Waters and Associated Materials*. Environment Agency Head Office, UK. <http://www.environment-agency.gov.uk>
- Garrity, G. ed. (July 26, 2005), [1984(Williams & Wilkins)], *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (in English) Vol. 2: The Proteobacteria Part B: The Gammaproteobacteria*. (2nd ed.), New York, Springer, 1106 p.
- Holt J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T. et Williams, S.T., (1994), *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Ninth edition, Williams & Wilkins, Baltimore, USA. 816 p.
- Health and Safety Executive, (2008), *Legionnaires' diseases-The control of Legionella bacteria in water systems- Approved Code of Practice and guidance*, HSE Books, UK, 68 p.
- ISO 11731, (1998), *Qualité de l'eau - Recherche et dénombrement de Legionella*, Organisation internationale de normalisation, Suisse, 17 p.
- ISO 11731-2 : (2004-F), *Qualité de l'eau - Recherche et dénombrement de Legionella, Partie 2: Méthode par filtration directe sur membrane pour les eaux à faible teneur en bactéries*, Organisation internationale de normalisation, Suisse, 10 p, Adopté par l'AFNOR en février 2008 (indice de classement AFNOR : T90-430).
- Microbial Identification System* (1998), Operating manual, Version 6, MIDI Inc., USA.
- Ministère du Développement durable, Environnement, Faune et Parcs du Québec (2013), *Protocole d'échantillonnage de l'eau du circuit des tours de refroidissement pour la recherche des légionelles*, Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec, 13 p. <http://www.ceaeq.gouv.qc.ca/documents/publications/echantillonnage.htm>
- Legionella Latex Test*, Diagnostic reagent, (2001-2012), OXOID limited, USA.
- U.S. Department of Health and Human Services, (2005), Public Health Service, Centers for Disease Control and Prevention, *Procedure for the Recovery of Legionella from the Environment*, Atlanta, USA, 13 p.
- Workplace Health and Safety Queensland, (2008), *Guide to Legionella Control in Cooling Water Systems, including Cooling Towers*, V2.06-08, Queensland Government, Department of Employment and Industrial Relations, Australia, 47 p.

**ANNEXE 1 :**

Liste des espèces de *Legionella* incluses dans la base de données du système *Instant FAME* de MIDI (octobre 2012)

*Legionella adelaidensis*  
*Legionella anisa*  
*Legionella birminghamensis*  
*Legionella brunensis*  
*Legionella cherrii*  
*Legionella cincinnatiensis*  
*Legionella fairfieldensis*  
*Legionella feeleeii*  
*Legionella geestiana*  
*Legionella gratiana*  
*Legionella jamestowniensis*  
*Legionella jordanis*  
*Legionella lansingensis*  
*Legionella londiniensis*  
*Legionella longbeachae*  
*Legionella nautarum*  
*Legionella oakridgensis*  
*Legionella parisiensis*  
*Legionella pneumophila*  
*Legionella quateirensis*  
*Legionella quinlivanii*  
*Legionella rubrilucens*  
*Legionella sainthelensi*  
*Legionella santicrucis*  
*Legionella shakespearei*  
*Legionella spiritensis*  
*Legionella tucsonensis*  
*Legionella wadsworthii*  
*Legionella worsleiensis*

**ANNEXE 2 :**

Liste des espèces de *Legionella* pouvant être confirmées par les différents tests d'agglutination de OXOID (octobre 2012)

*Legionella pneumophila* séro groupe 1  
*Legionella pneumophila* séro groupe 2-14  
*Legionella longbeachae* 1 & 2  
*Legionella bozemanii* 1 & 2  
*Legionella dumoffii*  
*Legionella gormanii*  
*Legionella jordanis*  
*Legionella micdadei*  
*Legionella anisa*