



MÉTHODE	VERSION	DATE D'ENTRÉE EN VIGUEUR
E-IV-2.1	2	10-12-2023
Prélèvement d' « eaux propres » en vue de la recherche de Legionella		

DESCRIPTIF		
Paramètres	légionelles	
Références normatives	ISO 19458	2006
	BSI 7592	2008

DOMAINE D'APPLICATION	
Matrice	Eaux propres

1. Objet

Cette procédure a pour objet d'expliciter la stratégie et les modalités de prélèvement d'échantillons d'eau pour la recherche de légionelles et les règles de sécurité propres à ce germe.

2. Procédure

2.1 Domaine d'application

La présente procédure est applicable aux eaux sanitaires, eaux de distribution, eaux de bains à bulles ou toutes autres eaux chaudes 'propres'.

2.2 Introduction

Legionella pneumophilla

Les légionelles sont des bactéries d'origine hydrotellurique ; elles sont présentes à l'état naturel dans les eaux douces (lacs et rivières) et les sols humides. Cette famille de bacilles à Gram négatif comporte 43 espèces. L'espèce *Legionella pneumophila* est responsable de 90 % des légionelloses et le sérotype 1 (Lp1) est associé à plus de 80 % des cas.

À partir du milieu naturel, la bactérie colonise des sites hydriques artificiels lorsque les conditions favorables à son développement sont réunies.

Ces conditions favorables se rencontrent dans différentes installations dites « à risque » telles que les réseaux d'eaux chaudes, les circuits des tours aéroréfrigérantes, les bains à bulles, les humidificateurs...

Les investigations réalisées lors d'épidémies et de cas sporadiques ont permis d'associer la maladie des légionnaires à deux sources principales, à savoir : d'une part les tours de refroidissement et condenseurs évaporatifs, et d'autre part, les systèmes de distribution d'eau sanitaire chaude.

La température de l'eau est un facteur important conditionnant la survie et la prolifération des légionelles dans les réseaux d'eau. Si ces germes sont capables de survivre à des températures basses (moins de 20 °C), ils prolifèrent entre 20 °C et 43 °C et leur viabilité est réduite à partir de 50 °C. La zone de température comprise entre 20 °C et 50 °C doit donc être réduite au maximum dans les réseaux d'eaux susceptibles de contaminer des personnes.

La contamination des personnes exposées se fait essentiellement par inhalation de fines gouttelettes d'eau (taille inférieure à 5 µm) contaminées et diffusées en aérosol. Ces aérosols atteignent les alvéoles pulmonaires, infestent les macrophages pulmonaires et provoquent leur destruction. Il n'y a pas de transmission inter-humaine.

Les légionelloses se manifestent sous deux formes cliniques distinctes :

- la fièvre de Pontiac, qui est une forme bénigne (syndrome pseudo-grippal) passant le plus souvent inaperçue,
- la maladie des légionnaires, qui se présente sous la forme d'une infection pulmonaire grave dont la létalité est de 20 %.

Des facteurs individuels, permanents ou passagers, tels que l'âge, l'alcoolisme, le tabagisme, l'immunodéficience, les affections respiratoires chroniques, peuvent induire une plus grande sensibilité au risque d'infection.

2.3 Stratégie d'échantillonnage

Les légionelles prolifèrent surtout sur les surfaces en contact avec l'eau et sont émises dans l'eau régulièrement et en fonction notamment des mouvements hydrauliques. La configuration de l'installation, les traitements préalables du réseau, l'emplacement des points d'échantillonnage, le choix d'un prélèvement direct ou différé sont autant de facteurs susceptibles d'influencer le dénombrement de légionelles. Le choix des lieux et des modalités de prélèvement relève de la stratégie d'échantillonnage.

La stratégie d'échantillonnage en vue de l'analyse de légionelles doit être adaptée à l'objectif poursuivi :



connaissance de l'exposition des personnes, diagnostic du réseau d'eau, mise en évidence de dysfonctionnement.

Dans la mesure du possible, la stratégie doit être établie conjointement par le client et le laboratoire, sinon la stratégie d'évaluation d'exposition aux légionelles est appliquée.

En fonction des informations récoltées auprès du client, trois types de stratégie peuvent lui être proposés :

- Evaluation de l'exposition aux légionelles
- Diagnostic de l'ensemble du réseau
- Recherche de dysfonctionnement

2.3.1 Evaluation de l'exposition aux légionelles

Cette stratégie permet de déterminer si les eaux chaudes présentes dans les installations du demandeur sont une source de contamination pour le personnel ou le public fréquentant l'établissement. Elle a un objectif de sécurité sanitaire souvent essentielle pour le client.

Cette stratégie implique la prise d'échantillons au niveau des douches, des bains à bulles ou tout autre générateur d'aérosols aqueux.

Les échantillons doivent être prélevés sur des zones utilisées où l'eau atteint plus de 20 °C en permanence.

Un circuit d'eau chaude comprend l'ensemble du système de chauffe et la distribution de l'eau sanitaire (douche : zone de contamination). Un ou deux points sont échantillonnés par circuit d'eau chaude sur le ou les pommeaux de douche situés le plus en aval du circuit. Si un système de chauffe est conçu avec des boucles d'eau sanitaires, alimentant plusieurs ensembles de douches assez éloignés les uns des autres, chacun d'entre eux devrait être considéré isolément.

L'ensemble de l'eau du premier jet de 1 litre est prélevé dans le flacon.

La technique de prélèvement au niveau des douches, robinets, vannes sont décrites au § 2.4 ci-dessous.

Dans le cas de cette stratégie le pommeau de douche, le robinet, ou la vanne ne sont pas désinfectés avant prélèvement. Cette stratégie a pour but de connaître l'exposition réelle des personnes et non savoir ce qui se passe dans le réseau.

Lorsque le prélèvement est effectué sur une vanne ou un robinet (diamètre inférieur à l'ouverture du flacon) dans cette stratégie, l'ouverture du flacon ne doit pas toucher ces derniers.

2.3.2 Diagnostic du réseau d'eau

Le diagnostic d'un réseau d'eau vise à déterminer le taux de contamination au niveau de ses différentes sections en vue d'évaluer globalement les traitements et/ou de choisir un éventuel traitement. Le diagnostic réalisé après un traitement a pour but d'évaluer le taux résiduel de légionelles dans les différentes sections du réseau et permet d'adapter les traitements ultérieurs.



Ce type de stratégie consiste à connaître les taux de concentration de légionelles dans l'eau du circuit en début de soutirage (premier jet, sans désinfection préalable) et après 45 ± 15 sec d'écoulement-rinçage.

L'étude d'un réseau peut impliquer la prise d'échantillons en plusieurs points de chaque circuit d'eau chaude. Pour chacun d'entre eux, 2 échantillons sont prélevés : un échantillon d'un litre sur le premier jet (zone d'accumulation potentielle de légionelles) et un échantillon d'un litre après 45 ± 15 sec d'écoulement (zone de contamination potentielle). Si le point d'utilisation n'a pas servi dans les 2 à 3 heures qui précèdent le prélèvement, la durée d'attente pour obtenir de l'eau chaude à ce point est un indicateur de l'état d'équilibrage du réseau. Ainsi, l'obtention rapide de l'eau chaude indique une circulation de l'eau satisfaisante dans les systèmes de retour de boucle de l'eau chaude sanitaire, ou indique la proximité du point de chauffe.

Par circuit d'eau chaude, les endroits généralement échantillonnés sont :

- Un prélèvement est réalisé au point le plus proche de la sortie de la production d'eau chaude et si nécessaire sur le point bas du ballon et/ou du réservoir de stockage de l'eau chaude
- Différents pommeaux de douche le long du circuit dont celui situé le plus en aval du ballon, en cas de présence de boucles de distribution d'eau chaude, chaque boucle peut être considéré comme un circuit indépendant.
- Les longues canalisations d'eau chaude alimentant des robinets
- Si possible les bras morts.

Il est parfois nécessaire de contrôler le réseau d'eau froide notamment lorsque celui-ci est jointif au réseau d'eau chaude non isolé ou est situé en partie près d'une source de chaleur.

L'échantillonnage s'effectuera en aval d'un long tronçon du réseau d'eau froide proche d'une source de chaleur. Si besoin, des points de prélèvement sont effectués en amont pour mieux circonscrire la zone contaminée.

La technique de prélèvement au niveau des douches, robinets, vannes sont décrites ci-dessous au § 2.4 ci-dessous.

2.3.2.1 Bassin de natation en Wallonie

Selon l'arrête du gouvernement wallon sur les normes sectorielles relatives aux bassins de natation du 13 juin 2013, il y a deux prélèvements sur les eaux sanitaires (douches) correspondant au diagnostic réseau, le 1er jet plus le second prélèvement qui s'effectue après écoulement de l'eau de 2 à 3 minutes. Cette adaptation doit être prise en compte pour les établissements avec bassin de natation.

2.3.3 Recherche de dysfonctionnements

Il y a dysfonctionnement lorsque le réseau d'eau est potentiellement favorable au développement des légionelles. La mise en évidence de dysfonctionnement permet ainsi de mieux connaître les zones de prolifération des légionelles.

Le facteur essentiel favorisant le développement des légionelles est la température de l'eau dans les différentes sections du réseau. La présence de dépôts, de tartre et d'un biofilm dans la canalisation est également un facteur aggravant.

Il est possible de mettre en évidence les zones favorables au développement des légionelles en mesurant la température aux différents points de soutirage le long du circuit.



La mesure de température débutera dès l'ouverture du point de soutirage et se déroulera jusqu'à stabilisation de la température de l'eau. L'estimation de la durée nécessaire à la stabilisation de la température permettra éventuellement d'affiner le diagnostic.

La mesure de température après stabilisation pourra déterminer si la température de l'eau est favorable au développement des légionelles et si la circulation d'eau chaude dans le circuit est satisfaisante (stabilisation de la température après un temps d'écoulement d'eau court).

La mesure de température sera effectuée dans un flacon de minimum 250 ml à large ouverture et placé sous le flux d'eau du robinet (ou autre point d'écoulement). Conjointement, le temps nécessaire à la stabilisation de la température sera chronométré. Une indication de la température peut être prise par un thermomètre à infrarouge, moins précis et avec des pertes thermiques dans le flacon mais qui permet de donner une indication de température. La mesure de la paroi du flacon après le prélèvement, après avoir attendu quelques instants que la paroi soit à température, permet également d'estimer la température.

2.4 Prélèvements

2.4.1 Généralités

Les échantillons sont prélevés dans des flacons stériles de 1 litre.

Lorsque l'échantillon à prélever est susceptible de contenir un agent désinfectant du type oxydant (chlore, brome, H₂O₂), les flacons contiennent 20 mg de thiosulfate de sodium. Ce composé assure la neutralisation des éventuels résidus des biocides oxydants. Les flacons sont annotés « + thiosulfate » ou « + T ».

Le thiosulfate n'étant pas efficace pour les biocides non-oxydants, un autre neutralisant devra être utilisé. Par exemple en cas de traitement avec les ions Cu-Ag (situation rare), le thiosulfate est remplacé par 1 ml d'EDTA stérile à 1 % dans le flacon de prélèvement.

Les flacons ne doivent pas être rincés avant utilisation. Ils sont remplis en tenant la bouteille de façon à éviter toute perte de thiosulfate et en limitant au mieux tout débordement. Cela permettra de garder un petit peu d'air sous le capuchon.

Pour les prélèvements par immersion dans l'eau à analyser (bains à bulles, fontaines), les flacons stériles seront sous emballage stérile. Ces flacons sont manipulés avec des gants à usage unique et une nouvelle paire de gants sera utilisée à chaque point de prélèvement.

Les échantillons sont clairement identifiés sur le lieu de prélèvement.

Quel que soit le site à visiter et la stratégie à appliquer, le préleveur complète une fiche de prélèvement.

Cette fiche reprendra, entre autres, les informations suivantes :

- les coordonnées de l'établissement (adresse, personne de contact,...),
- le type d'installation étudiée,
- la stratégie adoptée,



- la date et l'heure de prélèvement,
- le nombre et identification des échantillons, localisation exact du lieu de prélèvement

...

Les échantillons sont placés dans un Frigo box contenant un bloc réfrigéré par échantillon d'eau chaude et sont remis le jour même au laboratoire en vue de leur analyse.

2.4.2 Matériel

- Flaconnage : les échantillons sont prélevés dans des flacons (1 l) stériles en verre ou en plastique à usage unique. Les flacons en verre sont stérilisés au laboratoire.
- Le cas échéant, le flacon contiendra un neutralisant adéquat. Les flacons destinés à être plongé dans l'eau à analyser (jacuzzi, fontaines,...) seront conditionnés en emballage stérile individuel.
- Pissette de Norvanol ou assimilé + papier absorbant ou assimilé.
- Lingette désinfectante utilisée pour la désinfection des embouts, pommeaux si nécessaire.
- Thermomètre.
- Trousse de dosage du chlore.
- Sachets plastiques au moins « stérile machine ».
- Colsons.
- Paire de ciseaux.
- Frigo box de transport (+ blocs réfrigérants ou refroidisseur) ou assimilé.
- Nécessaire pour identification des échantillons.

2.4.3 Prélèvement au niveau des ballons d'eau chaude

Les réservoirs de stockage d'eau chaude sont assimilés à un ballon.

Le prélèvement se fait au plus près de la production d'eau chaude. Le prélèvement est effectué à la sortie d'un robinet ou d'une vanne (cf. 2.4.5).

Le prélèvement peut s'effectuer, si possible, au fond du ballon d'eau chaude.

Il est utile de soutirer d'abord les dépôts avant de faire le prélèvement, la présence de ces dépôts est signalée dans la fiche de prélèvement.

Si l'arrivée d'eau froide est située à proximité du point de puisage, il faut la fermer avant prélèvement.

S'il y a plusieurs ballons en série, le prélèvement sera réalisé au niveau du dernier. De même, s'il y a plusieurs ballons en parallèle, le prélèvement sera réalisé soit au niveau du ballon semblant présenter le plus grand risque de contamination (celui qui est en moins bon état ou celui présentant la température la plus basse) soit au niveau de celui choisi au hasard s'ils sont similaires. Cela afin de ne pas augmenter le nombre de prélèvements.

Le dénombrement de légionelles près de la production d'eau chaude ou dans l'eau des ballons d'eau chaude donne une indication sur l'état de contamination de cette zone mais n'est pas représentative de la qualité de l'eau sanitaire distribuée.



2.4.4 Prélèvement au niveau des douches

Lorsque l'installation compte plusieurs 'circuits' il est nécessaire de contrôler au moins une douche par circuit. C'est la douche où la perte de charge est la plus importante c'est-à-dire la plus éloignée du ballon d'eau chaude qui est généralement retenue.

Evaluation de l'exposition des personnes :

- Pour obtenir l'entièreté du premier jet sur un pommeau plus large que l'ouverture du flacon, il est nécessaire de fixer un sachet stérile au pommeau par un système de serrage type Colson.
- Ensuite désinfecter un coin du sac et les lames de ciseaux à l'aide d'une lingette désinfectante et couper le coin du sac. Il est ainsi possible de prélever l'entièreté du premier jet (1 litre).

Diagnostic de réseau : 2 prélèvements

- Fixer un sachet stérile au pommeau par un système de serrage type Colson.
- Ensuite désinfecter un coin du sac et les lames de ciseaux à l'aide d'une lingette désinfectante et couper le coin du sac
- Prélever l'entièreté du premier jet (1 litre).
- Retirer le 1er sac, et si possible retirer le pommeau ensuite pour prélever le second prélèvement ou sinon désinfecter le pommeau à l'aide d'une lingette imbibée d'alcool, et alors attendre 1 à 2 minutes et placer un nouveau sachet comme ci-dessus.
- Ouvrir le robinet et laisser couler 45 secondes \pm 15 sec avant de récolter le second prélèvement.

NB : Lorsque la présence d'un mitigeur ne peut être évitée, il est nécessaire de positionner celui-ci sur la température d'utilisation avant l'échantillonnage, généralement vers 37°C.

2.4.5 Prélèvement au niveau d'un robinet ou d'une vanne

Il est parfois nécessaire d'échantillonner au niveau d'un robinet ou d'une vanne lors d'un diagnostic du réseau ou lors d'une évaluation d'exposition des personnes.

Ce sont les vannes ou robinets alimentés par de l'eau chaude et généralement situés au bout d'une longue canalisation, ou ceux dont l'usage est peu courant (bras mort) qui sont sélectionnés pour l'échantillonnage.

Dans le cas d'un diagnostic réseau, l'extérieur du robinet (ou de la vanne) est désinfecté à l'aide d'une lingette désinfectante et l'intérieur via injection de norvanol liquide. (Attendre l'évaporation du désinfectant avant prélèvement).

Attention : adapter le mode de prélèvement en fonction de la stratégie d'échantillonnage (cf. 2.3.1 ou 2.3.2).

2.4.6 Réseau d'eau froide

Il est souvent recommandé de contrôler également l'eau du circuit d'eau froide lorsqu'il peut être réchauffé par une source de chaleur locale ou continue (proximité du circuit d'eau chaude). La mesure de la température de l'eau froide est aussi utile.



Si le but est d'évaluer la qualité de l'eau à l'entrée de l'installation, l'eau est prélevée après décontamination de la vanne et écoulement de l'eau pendant 45 ± 15 secondes afin d'éviter une éventuelle contamination périphérique.

Il est préférable de prendre l'échantillon sur un robinet simple. Dans le cas d'un prélèvement effectué sur un mélangeur ou mitigeur, il faut laisser couler 1 à 2 minutes afin de réduire le risque d'entraîner la flore périphérique lié à l'eau chaude, mais il n'est jamais certain que de l'eau chaude ne contamine pas cet échantillon.

2.4.7 Fontaines décoratives

L'eau des fontaines décoratives est susceptible d'être contaminée par des légionelles lorsque la température de l'eau est supérieure à 20 °C. Les jets d'eau en fines gouttelettes présentent potentiellement plus de risques que les fontaines à simple écoulement d'eau.

Le prélèvement s'effectue dans la masse d'eau. Le préleveur utilisera et manipulera de façon aseptique des flacons stériles (avec thiosulfate) conditionnés en emballage stérile.

- Après ouverture de l'emballage entourant le flacon, enfiler une paire de gants à usage unique.
- Maintenir le flacon dans son emballage tout en ouvrant le bouchon.
- Une fois le bouchon enlevé, prélever immédiatement en introduisant le flacon dans la masse d'eau, si possible à 30 ± 10 cm de profondeur (en s'écartant de l'arrivée de l'eau d'appoint).
- Après remplissage, sécher le flacon et annoter le (identification de l'échantillon).
- Remettre le flacon rempli dans son emballage avant de le placer dans le frigo box de transport.

2.4.8 Bains à bulles

Le prélèvement a lieu dans la masse d'eau après, si possible, l'arrêt du bullage.

Le prélèvement s'effectuera selon les modalités décrites ci-dessus (cf. 2.4.7).

2.5 Transport des échantillons légionelles

Les échantillons doivent être protégés de la chaleur et des rayons du soleil. Ils sont transportés dans une enceinte réfrigérante, frigo box avec blocs réfrigérants ou autre. Les eaux chaudes doivent être séparées des eaux froides. A chaque échantillon d'eau chaude qui est disposé dans un frigo box, 1 à 2 blocs réfrigérés sont ajoutés afin de réduire sa température jusqu'à au moins atteindre une température $< 20^{\circ}\text{C}$, mais cela dépend de la durée du transport et de la température de départ de l'échantillon.

Les échantillons doivent être rendus au laboratoire le jour du prélèvement, placés au réfrigérateur à $5^{\circ} \pm 3^{\circ}\text{C}$ et filtrés de préférence le jour même ou dans les 24 h qui suivent le prélèvement. Dans des cas exceptionnels, le délai entre le prélèvement et le début de l'analyse ne peut excéder 48 heures, l'échantillon doit alors être conservé à $5^{\circ} \pm 3^{\circ}\text{C}$.

Si des biocides présents dans l'échantillon ne peuvent être neutralisés (biocides autres que les oxydants et Cu/Ag) ils seront mentionnés dans le rapport et l'analyse sera effectuée le plus rapidement possible.



2.6 Mesure de sécurité à prendre par le préleveur

La zone de risques peut être définie comme étant l'espace où un individu est exposé à l'inhalation d'un aérosol d'eau potentiellement contaminé par *Legionella*.

Le risque doit être évalué de visu ou si les conditions sont connues de manière à adopter une sécurité respiratoire optimale du préleveur.

Les mesures de sécurité à prendre varient en fonction du lieu de prélèvement. Le risque lié à l'inhalation d'un aérosol d'eau potentiellement contaminé doit être prévenu par le port d'une protection respiratoire adaptée à la nature et à la durée du travail (type masque P3SL ou FFP3SL).

2.7 Interprétation des résultats d'analyse

La vigilance est de mise lors de l'interprétation des résultats d'une étude de réseaux d'eau sanitaire. Parmi les facteurs pouvant influencer ces résultats, le moment choisi pour l'échantillonnage et les traitements chocs réalisés sont déterminants :

- Le résultat d'analyse d'un prélèvement d'eau réalisé 2-4 jours après un choc chloré ou thermique est uniquement représentatif de l'efficacité ponctuelle du traitement. En général, le résultat est alors satisfaisant. Cependant, en aucun cas, ce résultat d'analyse ne doit être considéré comme le reflet d'une situation sous contrôle. La recolonisation d'un réseau peut intervenir très rapidement (2 à 4 semaines environ après le traitement). Il ne faut donc pas considérer ce résultat acquis comme un élément prouvant une maîtrise de la problématique liée aux légionelles ;
- L'heure de l'échantillonnage au point de puisage est aussi un facteur déterminant : le matin avant soutirage d'eau, les résultats obtenus correspondent à la stagnation de la nuit alors qu'en fin de matinée ou durant l'après-midi, ils correspondent à un tirage abondant. Les concentrations varient de même selon que le prélèvement est réalisé au premier jet ou après écoulement de l'eau.
- Si le point d'usage prélevé n'a pas été utilisé depuis plusieurs jours, les dénombrements peuvent dans certains cas augmenter de 1 à 2 log par rapport au point d'usage quotidiennement utilisé.

2.8 Rapport de prélèvement

Le rapport d'essais reprendra les données relatives aux prélèvements ; les informations suivantes y seront notamment reprises :

- Adresse du site de prélèvement,
- Date et heure de prélèvement,
- Date et heure du début de l'analyse,
- Description succincte de la localisation des points de prélèvements ainsi que les correspondances avec les échantillons analysés,
- Détails des conditions environnementales qui pourraient influencer les résultats d'essais ou aider à leur interprétation,
- Référence à la procédure de prélèvement et à la norme suivie et toute déviation par rapport à celle-ci.



3. Informations de révision

Les principales modifications apportées à cette procédure par rapport à la version précédentes sont :

4. Annexes

Sans objet