



MÉTHODE	VERSION	DATE D'ENTRÉE EN VIGUEUR
E-IV-2.2	2	10-12-2023
Prélèvement d' « eaux industrielles » en vue de la recherche de Legionella		

DESCRIPTIF		
Paramètres	légiionelles	
Références normatives	BSI 7592	2008
	ISO 19458	2006

DOMAINE D'APPLICATION	
Matrice	Eaux industrielles

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 industrielles (ex : tour de refroidissement).

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 séro groupe 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.

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 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 Echantillonnage, renseignements

Les légionelles prolifèrent surtout sur les surfaces en contact avec l'eau et sont émises régulièrement dans l'eau notamment en fonction des mouvements hydrauliques. La configuration de l'installation, les traitements préalables, l'emplacement des points d'échantillonnage, sont autant de facteurs susceptibles d'influencer le dénombrement de légionelles.

Diverses informations sont utiles à prendre avant le prélèvement :



- Type d'installation visée : tours aéroréfrigérées, bain de trempe, ...
- Intervention souhaitée : contrôle de routine, contrôle en situation de crise (cas de légionellose) ou évaluation d'efficacité de traitement de l'installation
- Les conditions de maintenance mises en œuvre (dont le biocide utilisé) et/ou la date de l'éventuelle dernier traitements choc (dont le biocide utilisé)

Le client fournit également les indications suivantes :

- Ses coordonnées + éventuellement le nom d'un contact
- L'adresse, les conditions d'accès au site de prélèvement
- Les règles de sécurité à mettre en œuvre lors du prélèvement (tour de refroidissement)

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 au moins 20 mg de thiosulfate de sodium (dépend de la concentration en chlore dans l'échantillon). 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 les flacons stériles seront sous emballage stérile. Lors de leur emploi, ces flacons sont manipulés de façon à ne pas contaminer l'extérieur du flacon qui doit être immergé.

Les échantillons sont clairement identifiés sur le lieu de prélèvement.

Quel que soit le site à visiter, il est conseillé au préleveur de compléter 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 date et l'heure de prélèvement,
- Le nombre et identification des échantillons,
- Les traitements en continu et/ou la date du dernier traitement choc



- ...

Les échantillons sont placés dans une enceinte réfrigérante 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 plongés dans l'eau à analyser seront conditionnés en emballage stérile individuel.
- Pissette de Norvanol ou assimilé + papier absorbant ou assimilé.
- Thermomètre.
- Trousse de dosage du chlore.
- Frigo box de transport (+ blocs réfrigérants ou refroidisseur) ou assimilé.
- Le nécessaire pour identification des échantillons.
- Lunette de protection.
- Gant à usage unique.
- Masque de protection.
- Canne de prélèvement, avant prélèvement celle-ci doit être décontaminée à l'aide d'un chiffon propre imbibé d'alcool. La canne peut être utilisée après évaporation de l'alcool (1 à 2 minutes). Après chaque campagne de prélèvement, la canne est nettoyée à l'aide d'un détergent, rincée à l'eau froide, séchée avant d'être emballée dans un sac plastique propre.

2.4.3 Prélèvement au niveau des tours aéroréfrigérantes et condenseurs à évaporation forcée

La tour aéroréfrigérante est principalement constituée d'un système de distribution de l'eau, d'un système d'échange thermique, d'un bassin récupérant l'eau refroidie, et d'un séparateur de gouttes ou dévésiculateur, le tout étant traversé par un courant d'air initié par tirage naturel ou par tirage forcé par ventilateur.

Les prélèvements sont réalisés sur des équipements en fonctionnement. Le client indiquera la date du dernier traitement chimique ou physique réalisé sur l'installation. Le prélèvement aura lieu au plus tôt 48 heures après un traitement choc.

Le prélèvement sera effectué au niveau du caisson de réception de l'eau de ruissellement ou au niveau du circuit d'eau selon l'accessibilité de l'eau à analyser (et si possible en aval de la source chaude).

2.4.3.1 Au niveau du caisson de réception de l'eau de ruissellement

Le prélèvement d'eau sera effectué directement dans le caisson si celui-ci est facile d'accès et que la sécurité du préleveur est assurée (c.-à-d. pas de courant d'air en direction du préleveur, vers l'extérieur du caisson et pas de présence de ventilateur ou autre appareil dangereux en fonctionnement près de la zone de prélèvement...).

Si le caisson n'est pas accessible facilement, qu'il est nécessaire de s'introduire dans une trappe à l'intérieur de la tour et que la ventilation est importante, il est alors demandé l'arrêt temporaire de la ventilation et de la circulation



d'eau. Le prélèvement s'effectue alors plusieurs minutes après l'arrêt. Si l'arrêt de l'installation est impossible, un autre point de prélèvement sera alors recherché ou aménagé par le client.

Les flacons destinés à être introduits dans l'eau sont conditionnés en emballage individuel stérile.

Pour le prélèvement dans la masse d'eau, le préleveur utilisera et manipulera de façon aseptique des flacons stériles conditionnés en emballage stérile.

Les étapes sont les suivantes :

- Maintenir le flacon dans son emballage tout en ouvrant le bouchon
- Tout en maintenant le flacon par le bouchon, disposer le soigneusement sur la canne de prélèvement sans contaminer l'extérieur du flacon.
- Une fois le bouchon enlevé, prélever immédiatement, introduire la canne et le flacon dans la masse d'eau à 30 ± 10 cm de profondeur (en s'écartant de l'arrivée de l'eau d'appoint).
- Après remplissage, fermer et sécher le flacon et annoter le (identification précise de l'échantillon).
- Placer dans le box de transport (frigo box ou assimilé).

2.4.3.2 Au niveau du circuit d'eau

Lors d'un échantillonnage au niveau du circuit d'eau, le prélèvement se fera à une vanne située en amont de la pulvérisation ou d'une vanne située en aval du caisson de ruissellement.

Il faut désinfecter l'extérieur et l'intérieur de l'embout à l'aide d'alcool dénaturé et ensuite laisser l'eau s'écouler 45 ± 15 sec avant de la recueillir l'eau dans le flacon.

2.4.4 Prélèvement au niveau d'installations de conditionnement d'air

Les systèmes qui utilisent l'eau pour refroidir ou humidifier l'air sont concernés par la problématique des légionelles. L'eau qui sert à refroidir ou humidifier l'air est susceptible de se retrouver dans l'air frais pulsé vers les locaux.

L'eau en excès est récupérée dans des bacs de contention. Si les dimensions du bac le permettent l'échantillonnage se fait par immersion d'un flacon stérile avec utilisation d'un gant à usage unique.

Dans le cas contraire, l'échantillonnage se fera par aspiration à l'aide d'une seringue stérile, d'une pipette stérile ou d'un petit récipient stérile qui permet de transvaser l'eau dans le flacon de prélèvement.

Si le bac de rétention n'est pas accessible ou le niveau d'eau trop bas, une canne de prélèvement préalablement décontaminée sera utilisée.

Au niveau des générateurs d'aérosols, l'eau est prélevée dans le réservoir ou sur une vanne selon un mode de soutirage approprié à chaque système, comme cité ci-dessus dans les bacs de rétention. Le dispositif de traitement d'eau situé en amont peut faire également l'objet d'un prélèvement.

2.5 Transport des échantillons légionelles



Les échantillons doivent être protégés de la chaleur et des rayons du soleil. Ils sont conservés et transportés dans une enceinte réfrigérante, frigo box avec blocs réfrigérants ou autre. Les eaux chaudes doivent être séparées des eaux froides. Pour ce faire chaque échantillon d'eau chaude est disposé dans un frigo box, avec 1 à 2 blocs réfrigérés 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*. Ces zones de productions d'aérosols assez importantes concernent notamment les tours de refroidissement.

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).

Quel que soit le type de protection, la date de péremption du produit ne doit pas être dépassée.

L'ensemble de ces protections doit être stocké dans un endroit sec, propre et aéré.

Remarques complémentaires :

Certaines entreprises imposent des mesures de sécurité supplémentaires (chaussures de sécurité, lunettes de protection, casque de protection).

Les règles de sécurité à appliquer varient selon les sites de production d'aérosols à visiter.

- Au niveau des tours de refroidissement, il est conseillé de ne pas s'approcher du côté du panache de vapeurs et de prélever l'eau aux endroits accessibles où la probabilité de présence d'aérosols est faible. Il est déconseillé d'entrer totalement dans une tour : si elle est en fonction, il est alors demandé l'arrêt temporaire de la ventilation et de la circulation d'eau avant le prélèvement (sauf impératif justifié par la nécessité de maintenir le fonctionnement de la tour). Un temps de latence suffisant entre l'arrêt du fonctionnement de la tour et le prélèvement doit permettre aux gouttelettes d'eau de se déposer.
- Lors d'un travail dans une atmosphère saturée en humidité dans les tours de refroidissement, le port du masque respiratoire à ventilation assistée est conseillé.
- Dans les autres cas, la présence d'aérosols est évaluée de visu de manière à adopter une sécurité respiratoire optimale.



2.7 Interprétation des résultats d'analyse

Parmi les facteurs pouvant influencer les résultats : les maintenances et les traitements chocs réalisés sont déterminants.

Le résultat d'analyse d'un prélèvement d'eau réalisé immédiatement et jusque 48h00 après un traitement chimique ou physique 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.

2.8 Rapport de prélèvement

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

- Date de prélèvement,
- Adresse du site de prélèvement,
- Description succincte des points de prélèvements (localisation précise de l'échantillonnage) 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