

E-IV-2.2V1 – PROCEDURE PARTICULIERE RELATIVE AU PRELEVEMENT D'EAUX « INDUSTRIELLES » EN VUE DE LA RECHERCHE DE LEGIONELLES

1. Objet

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

2. Domaine d'application

La présente procédure est applicable aux eaux industrielles (ex : tour de refroidissement).

3. 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 serogroupe 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 plusieurs mois 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 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.

La recherche et le dénombrement des légionelles au sein du laboratoire de microbiologie de l'ISSeP sont réalisés selon la méthode E-IV-1 (méthode de référence ISO 11731).

4. Stratégie d'échantillonnage

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

Pour les nouveaux clients, le premier contact téléphonique permet l'échange d'informations nécessaires à la prise de décisions.

- Type d'installation visée : tours aéroréfrigérées, bain de trempage,...
- 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 l'application éventuelle de traitements de choc (dont le biocide utilisé)
- Renseignement sur les légionelles : écologie, zones potentielles de prolifération, mode de contamination
- les différentes stratégies d'échantillonnage

Le client fournit également les indications suivantes:

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

5. Prélèvements

5.1 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, 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 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.

5.2 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 (4.1) 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
- Lingette désinfectante utilisée pour la désinfection des embouts
- Thermomètre.
- Trousse de dosage du chlore.
- Frigo box de transport identifié spécifiquement pour les prélèvements légionelles (leg pn) (+ blocs réfrigérants ou refroidisseur).
- Nécessaire pour identification des échantillons
- Lunette de protection.
- Masque de protection
- Canne de prélèvement ou dispositif stérile pour aspiration d'eau. Lorsqu'elle est utilisée, la canne de prélèvement doit être décontaminée à l'aide d'un chiffon propre imbibé d'alcool ou lingette désinfectante à base 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.

5.3 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 dévésiculeur, 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 celui-ci.

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

5.3.1 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 est demandé. 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 (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, prélevé immédiatement en introduisant le flacon dans la masse d'eau. à 30 ± 10 cm de profondeur (en s'écartant de l'arrivée de l'eau d'appoint). Une canne de prélèvement sera utilisée si l'eau dans le caisson n'est pas facilement accessible.
- 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

5.3.2 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 et ensuite laisser l'eau s'écouler 45 ± 15 sec avant de la recueillir dans le flacon.

5.4 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 selon la technique de prélèvement est décrite au point 5.3.1.

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 cités ci-dessus. Le dispositif de traitement d'eau situé en amont peut faire également l'objet d'un prélèvement.

6. Transport des échantillons légionelles

Les échantillons doivent être protégés de la chaleur et des rayons du soleil. Ils sont conservés dans un frigo box à température ambiante (environ 20 °C). Pour ce faire, chaque échantillon d'eau chaude est disposé dans le frigo box avec 1 bloc réfrigéré.

NB : le transport et le stockage des échantillons à une température inférieure à 6 °C peuvent réduire la viabilité des légionelles.

Les échantillons doivent être rendus au laboratoire le jour du prélèvement et filtré de préférence dans les 24 h qui suivent le prélèvement. Le délai entre le prélèvement et le début de l'analyse ne peut excéder 48 heures. La date de prélèvement et la date de filtration correspondant au début de l'analyse seront indiquées sur le rapport.

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.

7. 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 sont notamment les tours de refroidissement.



Quel que soit le type de prélèvement entrepris, s'il y a un doute sur la présence d'un risque de contamination par Legionella, des mesures de sécurité respiratoire doivent être prises. En effet, des facteurs individuels, permanents ou passagers, peuvent induire une plus grande sensibilité au risque d'infection chez le 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.

En ce qui concerne le type de protection, le choix peut se faire entre :

- un filtre de type P3SL contre les aérosols solides et liquides qui assure un niveau élevé de filtration du milieu ambiant. Tout utilisateur d'une protection respiratoire P3SL doit au préalable s'assurer de son bon état et veiller à un ajustement correct.
- un demi-masque FFP3SL dit « masque jetable » qui n'assure pas une protection prolongée en ambiance saturée en humidité. Leur usage est unique et ils doivent par conséquent être jetés après chaque intervention.
- un appareil de protection respiratoire à ventilation assistée qui est recommandé lorsque les risques évalués sont particulièrement élevés (par exemple, des interventions en milieu confiné exposant à des aérosols en quantité importante ou pendant une longue durée). Ce type d'appareil améliore le confort et la protection des intervenants pour des opérations prolongées. Les équipements à cartouche sont réutilisables ; le masque doit être nettoyé après chaque usage et la cartouche doit être remplacée dès qu'elle présente une résistance mécanique à la respiration.

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.

8. Interprétation des résultats d'analyse

Parmi les facteurs pouvant influencer les résultats, le moment choisi pour l'échantillonnage, les maintenances et les traitements chocs réalisés sont déterminants

Le résultat d'analyse d'un prélèvement d'eau réalisé immédiatement 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.

9. 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 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

10. Références

Circulaire DGS/SD7A/SD5C-DHOS/E4 n° 2002/243, 22/04/2002, relative à la prévention du risque lié aux légionelles dans les établissements de santé

Circulaire DGS/VSA n°98-771, 31/12/1998, relative à la mise en œuvre de bonnes pratiques d'entretien des réseaux d'eau dans les établissements de santé et aux moyens de prévention du risque lié aux légionelles dans les installations à risque et dans des bâtiments recevant du public

BSI 7592: 2008 – sampling for Legionella bacteria in water systems- code of practice

ISO 19458 2006 – Qualité de l'eau - Échantillonnage pour analyse microbiologique

