

E-IV-1V1 – RECHERCHE ET DENOMBREMENT DE *LEGIONELLA PNEUMOPHILA* DANS LES EAUX

1. Objet

Cette procédure décrit la méthode de recherche et de dénombrement de *Legionella pneumophila* dans les eaux.

2. Domaine d'application

Cette procédure s'applique à tous les types d'eau y compris les eaux sanitaires, les eaux de tours de refroidissement, les eaux industrielles, les eaux de jacuzzi / piscine et les eaux de conditionnement d'air.

3. Définitions et abréviations

Legionella : bactéries Gram négatif, normalement capables de croître en deux jours au moins en présence de L-cystéine et du fer (III) sur gélose tamponnée au charbon actif et à l'extrait de levure, à 36 ± 2 °C et formant des colonies, d'une couleur souvent blanche, pourpre-bleu ou vert-jaune.

NB : certaines espèces sont fluorescentes sous lumière UV de grande longueur d'onde. Les colonies ont un aspect de verre fritté lorsqu'elles sont observées avec un microscope stéréoscopique de faible puissance. A de rares exceptions près la croissance n'a pas lieu en l'absence de L-cystéine

4. Principe

Les échantillons d'eau sont concentrés par filtration sur une membrane filtrante de porosité 0.22 µm ou 0.45 µm

Afin de réduire le développement de bactéries interférentes, une partie de l'échantillon concentré est soumise à un traitement acide, l'autre partie subissant un traitement thermique. Les fractions traitées et non traitées sont ensuiteensemencées sur gélose sélective, contenant de la L-cystéine, du fer (III) et un supplément d'antibiotique, et incubées à 36 ± 2 °C pendant maximum 10 jours.

Les colonies présumées sont confirmées par mise en évidence du besoin en L-cystéine et en fer pour leur développement.

Les colonies présumées suspectes sont confirmées par des essais sérologiques.

Le flowsheet reprenant l'ensemble des opérations est repris en annexe 1.



5. Conditionnement et conservation de l'échantillon

Les échantillons prélevés devraient être transportés à une température comprise entre 6 °C et 18 °C et protégés de la chaleur et des rayons du soleil.

Les échantillons d'eau doivent être conservés à 5 ± 3 °C. Ils doivent être concentrés de préférence dans les 24 h et impérativement dans les 2 jours qui suivent le prélèvement.

Le délai entre le prélèvement et l'ensemencement du concentré ne peut dépasser 10 jours.

Si l'échantillon d'eau contient ou est supposé contenir un biocide oxydant, un excès de neutralisant (thiosulfate de potassium ou de sodium) doit être ajouté au flacon de prélèvement avant ou au moment du prélèvement.

6. Appareillages et matériels utilisés

6.1 Appareillage

- Rampe de filtration.
- Autoclave.
- Agitateur de type vortex
- Incubateur pouvant être maintenu à 36 ± 2 °C.
- Bloc chauffant pouvant être maintenu à 50 ± 1 °C.
- Compteur de colonies.
- Microscope stéréoscopique
- Hotte à flux laminaire de sécurité biologique

6.2 Petit matériel

Du petit matériel stérile à usage unique est utilisé : pipettes en plastique de 10 ml, tips, boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre, pots de 50 ml ou tubes de 12 ml en plastique avec bouchon à visser, microtubes de 1.5ml, étaleurs en « L », öses de prélèvement

Des membranes filtrantes en polycarbonate de 0.2 µm ou 0.4 µm de porosité, de 47 mm de diamètre.

Tout le matériel utilisé est propre. La verrerie est nettoyée au lave vaisselle pour laboratoire (eau + détergent, eau de rinçage, eau acidifiée, eau déminéralisée).

La verrerie est stérilisée soit à 170 ± 5 °C pendant 1 h dans un four ou à 121 ± 1 °C pendant 20 minutes à l'autoclave.

7. Réactifs utilisés

La composition des milieux et des réactifs cités ici est reprise en annexe 2.

7.1 Gélose sélective ‘GVPC’

La croissance de *Legionella* est favorisée par la présence de charbon actif qui capte le CO₂ et neutralise les inhibiteurs de croissance. La L-cystéine est utilisée pour la formation d’acides aminés et l’ α -cétooglutarate sert de chélatant. Le pyrophosphate ferrique fournit le fer ; le pH de croissance optimal est ajusté par le tampon ACES.

Parallèlement, la flore secondaire est largement inhibée par la présence de glycine et d’un mélange d’antibiotiques (vancomycine, polymyxine B et cycloheximide).

7.2 Milieu de confirmation “ BCYE ”

Ce milieu correspond au milieu GVPC pour lequel le supplément glycine + antibiotiques a été omis. Il contient tous les éléments favorisant la croissance des légionelles mais ne contient pas de substances inhibitrices.

7.3 Souches pour le contrôle qualité des milieux

Des matériaux de référence disponibles dans le commerce, sont généralement utilisés afin de contrôler la qualité des milieux GVPC et BCYE (cf. alors la méthode du fabricant).

7.4 Agar nutritif

Simple gélose nutritive dépourvue de L- cystéine et de source de fer.

7.5 Tampon acide (HCl / KCl) concentré 10x

Pour la réalisation du traitement acide.

7.6 Diluant

La solution de Ringer 1/40 stérile est utilisée pour la préparation du concentrat. Il s’agit d’une solution Ringer 1:4 diluée 10 fois.

7.8 Serum anti-*Legionella pneumophila* sérogroupes 1 et 2 à 14 (15) ; sérum anti legionella spp pathogènes

Ces 2 sérums servent à confirmer et à identifier l’espèce *Legionella pneumophila*.

Un sérum détermine l’appartenance de la bactérie au séro groupe 1 et le second indique l’appartenance au groupe des sérogroupes 2 à 14 ou 2 à 15 selon le fabricant.



8. Mode opératoire

8.1 Préparation de l'échantillon

- Filtrer l'échantillon de préférence dans les 24 h qui suivent le prélèvement (cependant un délai de 2 jours peut être admis).
- Adapter le volume à filtrer en fonction du type d'échantillon à analyser. Il sera de préférence de 1 litre pour les eaux 'propres'. Pour des eaux chargées, le volume sera réduit et la limite de détection sera alors recalculée. Cependant, le résultat final sera toujours exprimé en nombre de légionelles par litre.

8.2 Concentration par filtration

- Filtrer l'échantillon d'eau (1 litre ou moins) sur une membrane de 0.2 μm ou 0.4 μm de porosité selon l'importance des matières en suspension présentes. Les eaux plus chargées comme notamment les eaux des tours de refroidissement ou industrielles nécessitent l'utilisation de membranes de porosité de 0.4 μm .
- Placer le filtre dans un récipient à bouchon à vis (généralement un tube de 12 ml stérile) tout en respectant les conditions d'asepsie.
- Pour détacher les micro-organismes du filtre, ajouter 5 ml à 25 ml (généralement 5 ml) de la solution Ringer 1/40 au tube et agiter vigoureusement pendant 1 à 2 min par exemple sur un vortex à vitesse élevée.

Le concentré est de préférence analysé immédiatement après sa préparation. Cependant, il peut être conservé avant analyse (traitement et étalement) à 5 ± 3 °C et à l'obscurité pendant 10 jours (au maximum).

NB : Des dilutions 1/10 ou plus du concentré avec le diluant R 1:40 peuvent se révéler indispensables dès la première observation des géloses.

8.3 Traitements

Le concentra obtenu (8.2) est 'divisé' en trois portions :

- une portion (1 ml) pour le traitement thermique
- une portion (900 μl) pour le traitement acide
- le restant du concentra à partir duquel les étalements sans traitement seront réalisés. Cette portion sera conservée au maximum pendant 10 jours pour d'éventuelles dilutions (cf. 8.2)

Traitement thermique

Placer un microtube stérile, contenant 1 ml d'échantillon concentré dans un bloc chauffant à 50 ± 1 °C pendant 30 ± 2 min.

Traitement acide

Ajouter 100 μl d'une solution concentrée 10x du tampon acide à 900 μl d'échantillon concentré, et laisser l'échantillon à un pH de 2.2 ± 0.2 pendant 5 ± 0.5 min.



8.4 Ensemencement sur milieu sélectifs

L'étalement des aliquotes traitées doit s'effectuer dans les plus brefs délais après les traitements.

- Ensemencer les boîtes de gélose GVPC avec 0.1 ml de chacune des 3 portions (traitement acide, traitement thermique et sans traitement)
- Répartir l'inoculum sur toute la surface de la boîte à l'aide d'un étaleur stérile. Plusieurs rotations de l'étaleur peuvent être nécessaires, l'inoculum doit être absorbé par la gélose avant incubation.

L'ensemencement des géloses doit être réalisé sous hotte à flux laminaire de sécurité biologique.

8.5 Incubation

- Vérifier que l'inoculum est entièrement absorbé par le milieu
- Fermer les boîtes avec du parafilm (pour éviter le dessèchement)
- Les retourner et les mettre à incuber pendant 10 jours dans un incubateur réglé à 36 ± 2 °C.

8.6 Lecture et confirmation

Les colonies de *Legionella* présentent souvent une coloration blanche, grise, bleue ou pourpre mais peuvent également être marron, rose, vert jaune ou rouge foncé. Leur surface est lisse, leur bord bien net et elles ont une apparence caractéristique de verre pilé.

Sous une lumière ultraviolette (360 ± 20 nm), les colonies de différentes espèces peuvent émettre une fluorescence.

NB : ne pas exposer les boîtes sous une lumière ultraviolette plus longtemps que nécessaire.

Les géloses doivent être examinées à des intervalles réguliers (3 à 5 jours) pendant la période d'incubation.

- Observer les géloses après 3 jours d'incubation. Si les colonies sont présentes en grand nombre pour les fractions traitées (> 300) recommencer l'analyse à partir du concentré non traité (8.3) en introduisant une étape de dilution.
- Examiner les géloses et dénombrer les colonies de chaque type après 5, 8 et 10 jours d'incubation.
- Sélectionner 2 colonies isolées caractéristiques de chaque type (ou au moins trois au total si un seul type est présent) pour isolement en parallèle sur milieu BCYE et sur agar nutritif.
- Mettre incuber ces boîtes à 36 ± 2 °C pendant au moins 2 jours.
- Considérer comme *Legionella* toutes les colonies qui se développent sur le milieu BCYE et qui ne se développent pas sur l'agar nutritif.
- Confirmer l'appartenance de chaque type de colonie à l'espèce *Legionella pneumophila* par un test sérologique. Un sérum détermine l'appartenance de la bactérie au sérotype 1 ; un autre indique l'appartenance au groupe des sérotypes 2 à 14 (ou 15). Certains kits contiennent un sérum supplémentaire permettant de déterminer la présence de *Legionella spp* (non pneumophila) pathogènes



9. Paramètres qualité

Le contrôle de qualité des essais sera réalisé par :

- Le contrôle des conditions d'essais : délais entre le prélèvement et l'analyse, condition de conservation des échantillons, qualité des milieux de culture, surveillance des températures d'incubation,...
- L'utilisation de matériaux de référence quantifiés et construction de cartes guides
- Le contrôle externe par la participation à des exercices interlaboratoires

10. Calcul et expression de résultats

- Choisir parmi les 3 boîtes de milieu GVPC (sans traitement, avec traitement acide et avec traitement thermique) la boîte présentant le plus grand nombre de colonies confirmées.
- Calculer le nombre d'unités de *Legionella* formant colonie (ufc) (N) de chaque sérotype confirmé, dans le volume de l'échantillon analysé, en multipliant par le facteur de concentration selon la formule ci-dessous :

$$N = \frac{n * C}{E * D}$$

N= le nombre de colonies confirmées par volume de l'échantillon filtré,

n = le nombre de colonies sur la gélose comptée,

C = le volume du concentrat en ml,

E = le volume de l'inoculum en ml,

D= la dilution de l'échantillon concentré (1= non dilué, 0.1 = dilution 1/10 ...).

- Ramener à un nombre de colonies par litre.
- Lorsque aucune colonie du germe cible n'a été détectée indiquer « < n » où n est la limite de détection pour le volume d'échantillon analysé en tenant compte des éventuelles dilutions réalisées.

11. Sécurité

Legionella pneumophila est une bactérie de classe de risque 2 qui provoque la légionellose. La transmission se fait par inhalation d'aérosol d'eau contaminée, mais pas d'homme à homme. La légionellose se soigne par antibiothérapie.

Au laboratoire certaines mesures doivent être prises pour limiter le risque.

- Utiliser une hotte de sécurité biologique lors de l'ensemencement des géloses et lors de l'isolement des colonies.
- Ne pas stériliser des anses en platines à la flamme en dehors de la hotte de sécurité biologique.

12. Rapport d'essai

Le rapport doit contenir au minimum :

- une référence à la présente méthode de la Région wallonne et éventuellement à la méthode normalisée
- l'identification complète de l'échantillon
- la date de prélèvement ; ceci qu'il ait été réalisé par le laboratoire ou par le client
- la date d'analyse
- les résultats du dénombrement conformément au point 10 pour chaque séro groupe et le volume d'échantillon analysé.
- les détails opératoires non prévus dans la présente méthode, ainsi que tout facteur ayant pu affecter les résultats.

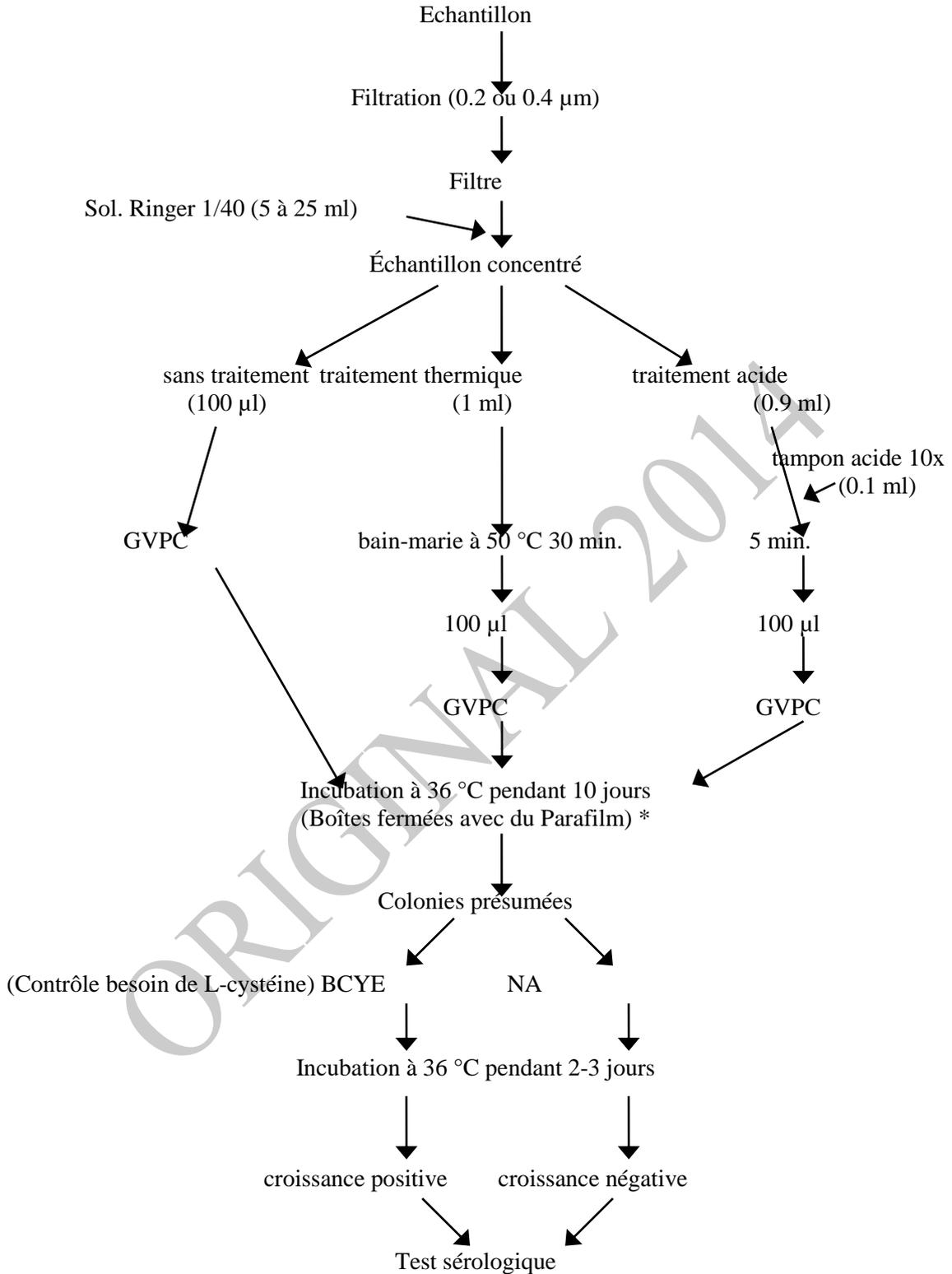
13. Références

ISO 11731 (1998) Qualité des eaux - Recherche et dénombrement des *Legionella*

ISO 8199 (2005) Water quality -- General guidance on the enumeration of micro-organisms by culture

ORIGINAL 2014

ANNEXE 1 : FLOWSHEET



* Modification par rapport à la norme ISO 11731



ANNEXE 2 : MILIEUX DE CULTURE ET REACTIFS

Cette annexe reprend, à titre d'exemple, la composition et la préparation des milieux/ réactifs de la marque la plus couramment utilisée par le laboratoire de microbiologie de l'ISSEP.

Milieu de culture " CYE (Charcoal Yeast Extract) Agar Base " (OXOID)

composition du milieu préparé :

Charbon actif 2 g / l

Extrait de levure 10 g / l

Agar 13 g / l

Supplément " BCYE " (OXOID)

composition :

Tampon ACES / hydroxyde de potassium 10 g / l

(Acide [N-(2-acétomido)-2-amino]éthanosulfonique)

Pyrophosphate de fer (III) 0,25 g / l

Chlorhydrate de L-cystéine 0,4 g / l

α -cétoglutarate 1 g / l

Dissoudre 12.5 g du milieu CYE Agar Base dans 450 ml d'eau déminéralisée et ensuite l'autoclaver pendant 15 minutes à 121 °C. Laisser refroidir à 50 °C et ajouter aseptiquement un flacon du supplément BCYE (pour 500 ml de milieu) reconstitué dans 50 ml d'eau stérile.

Mélanger et répartir dans des boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre. Les boîtes peuvent être conservées à 4°C pendant un mois maximum.

pH final du milieu solide : 6.9 ± 0.2

Couleur du milieu : noir.

Couleur des colonies : blanches, grises, vertes...

Supplément " GVPC " (OXOID)

composition (pour ajouter à 500 ml de BCYE à 50°C) :

Glycine exempte d'ammonium 1,5 g

Chlorhydrate de vancomycine 0,5 mg

Sulfate de polymyxine B 39600 IU

Cycloheximide 40 mg

Dissoudre le contenu d'un flacon, aseptiquement, avec 10 ml d'eau déminéralisée stérile. Ajouter ce supplément à 500 ml de milieu BCYE stérilisé et refroidi à 50°C.

Mélanger et répartir dans des boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre. Les boîtes peuvent être conservées à 4°C pendant un mois maximum.

pH final du milieu solide : 6.9 ± 0.2

Couleur du milieu : noir.

Couleur des colonies : blanches, grises, vertes...



Milieu de culture “ Agar Nutritif ” (OXOID)

composition du milieu préparé :

Poudre ‘ Lab-Lemco’ 1 g / l
Extrait de levure 2 g / l
Peptone 5 g / l
Chlorure de sodium 5 g / l
Agar 15 g / l

De l’eau déminéralisée : 1000 ml

Dissoudre la poudre déshydratée dans de l’eau déminéralisée et ensuite autoclaver pendant 15 minutes à 121°C. Mélanger et répartir dans des boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre.

Les boîtes peuvent être conservées à 4°C pendant 1 mois maximum.

pH final du milieu solide : $7,4 \pm 0,2$
Couleur du milieu : jaunâtre.

Bouillon au glycérol (Eau peptonée + glycérol)

Composition

Peptone 10 g
Chlorure de sodium 5 g
tampon phosphate 10g
Glycérol 150 ml
Eau déminéralisée 850 ml

En pratique : dissoudre 5g de poudre d’Eau Peptonée dans 170 ml et ajouter 30 ml de glycérol, stériliser par autoclavage à $121^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ pendant 15 minutes et répartir dans des conditions aseptiques 1,2ml du bouillon stérile dans des tubes pour congélation stérile. Conserver à $5^{\circ} \pm 3^{\circ}\text{C}$ pendant 2 mois.

Tampon Acide concentré 10x

Préparer une solution d’acide chlorhydrique à 2 mol/l en ajoutant 16,7 ml de HCl fumant (1,19g/ml, teneur minimale 37%) à un 100 ml d’eau déminéralisée (solution A) et une solution de chlorure de potassium à 2 mol/l en dissolvant 14,9 g de KCl dans 100 ml d’eau déminéralisée (solution B). Pour la préparation du tampon acide, mélanger 3,9 ml de la solution A et 25 ml de la solution B.

Le pH est ajusté à $1,0 \pm 0,2$ en ajoutant une solution d’hydroxyde de potassium à 10 mol/l.

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



Solution de Ringer 1/40

Dissoudre une tablette de solution Ringer ¼ dans 500 ml d'eau déminéralisée et stériliser par autoclavage à 121°C pendant 25 minutes.

Préparer aseptiquement, en utilisant de l'eau déminéralisée stérile, une dilution 1/10 de la solution antérieure pour obtenir la solution Ringer diluée.

Legionella Latex Test

Test d'agglutination pour l'identification de l'espèce *Legionella pneumophila* serogroupe 1 et (2-14) ou (2-15) ; méthode : suivre la notice du fabricant.

ORIGINAL 2014