
**Qualité de l'eau — Dénombrement des
*Legionella***

Water quality — Enumeration of Legionella

**iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)**

[ISO 11731:2017](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/4d5f1cc4-844f-4fe6-a26d-d3011c32633c/iso-11731-2017)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/4d5f1cc4-844f-4fe6-a26d-d3011c32633c/iso-11731-2017>



iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 11731:2017

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/4d5f1cc4-844f-4fe6-a26d-d3011c32633c/iso-11731-2017>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2017, Publié en Suisse

Droits de reproduction réservés. Sauf indication contraire, aucune partie de cette publication ne peut être reproduite ni utilisée sous quelque forme que ce soit et par aucun procédé, électronique ou mécanique, y compris la photocopie, l'affichage sur l'internet ou sur un Intranet, sans autorisation écrite préalable. Les demandes d'autorisation peuvent être adressées à l'ISO à l'adresse ci-après ou au comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

ISO copyright office
Ch. de Blandonnet 8 • CP 401
CH-1214 Vernier, Geneva, Switzerland
Tel. +41 22 749 01 11
Fax +41 22 749 09 47
copyright@iso.org
www.iso.org

Sommaire

Page

Avant-propos.....	v
Introduction.....	vi
1 Domaine d'application	1
2 Références normatives	1
3 Termes et définitions	1
4 Principe	2
4.1 Généralités.....	2
4.2 Examen.....	2
4.3 Confirmation.....	2
5 Appareillage et verrerie	2
6 Milieus de culture et réactifs	3
7 Échantillonnage	4
8 Mode opératoire	5
8.1 Échantillons.....	5
8.2 Concentration des échantillons d'eau.....	5
8.2.1 Généralités.....	5
8.2.2 Filtration sur membrane et dépôt direct de la membrane filtrante sur milieu de culture.....	5
8.2.3 Filtration sur membrane suivie d'une procédure de lavage.....	5
8.3 Prétraitement de l'échantillon.....	6
8.3.1 Traitement thermique.....	6
8.3.2 Traitement acide.....	6
8.4 Culture.....	6
8.4.1 Généralités.....	6
8.4.2 Échantillons ayant une forte concentration en <i>Legionella</i> et une faible concentration en micro-organismes interférents.....	7
8.4.3 Échantillons ayant une faible concentration en <i>Legionella</i> et une faible concentration en micro-organismes interférents.....	7
8.4.4 Échantillons ayant une forte concentration en micro-organismes interférents.....	7
8.4.5 Échantillons ayant une très forte concentration en micro-organismes interférents.....	7
8.4.6 Incubation.....	8
8.4.7 Examen des boîtes.....	8
8.5 Confirmation des colonies présomptives de <i>Legionella</i> sur milieux de culture: géloses BCYE et BCYE sans cys.....	8
9 Expression des résultats	9
10 Rapport d'essai	10
11 Assurance qualité	10
11.1 Généralités.....	10
11.2 Essais de performance des milieux de culture de <i>Legionella</i>	10
11.3 Préparation de la culture de travail et de la suspension pour les essais de performance.....	10
Annexe A (informative) Espèces de <i>Legionella</i>	12
Annexe B (normative) Milieux de culture	14
Annexe C (normative) Diluants	20
Annexe D (normative) Solution d'acide	21
Annexe E (informative) Retrait des bactéries par grattage ou frottement des membranes filtrantes	22

Annexe F (informative) Technique de centrifugation	23
Annexe G (informative) Technique des anticorps par immunofluorescence indirecte pour l'identification des espèces de <i>Legionella</i>	24
Annexe H (informative) Données de performance	27
Annexe I (informative) Matrices de pré-traitement liées à l'eau	32
Annexe J (normative) Matrice de décision	33
Bibliographie	39

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 11731:2017](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/4d5f1cc4-844f-4fe6-a26d-d3011c32633c/iso-11731-2017)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/4d5f1cc4-844f-4fe6-a26d-d3011c32633c/iso-11731-2017>

Avant-propos

L'ISO (Organisation internationale de normalisation) est une fédération mondiale d'organismes nationaux de normalisation (comités membres de l'ISO). L'élaboration des Normes internationales est en général confiée aux comités techniques de l'ISO. Chaque comité membre intéressé par une étude a le droit de faire partie du comité technique créé à cet effet. Les organisations internationales, gouvernementales et non gouvernementales, en liaison avec l'ISO participent également aux travaux. L'ISO collabore étroitement avec la Commission électrotechnique internationale (IEC) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les procédures utilisées pour élaborer le présent document et celles destinées à sa mise à jour sont décrites dans les Directives ISO/IEC, Partie 1. Il convient, en particulier de prendre note des différents critères d'approbation requis pour les différents types de documents ISO. Le présent document a été rédigé conformément aux règles de rédaction données dans les Directives ISO/IEC, Partie 2 (voir www.iso.org/directives).

L'attention est appelée sur le fait que certains des éléments du présent document peuvent faire l'objet de droits de propriété intellectuelle ou de droits analogues. L'ISO ne saurait être tenue pour responsable de ne pas avoir identifié de tels droits de propriété et averti de leur existence. Les détails concernant les références aux droits de propriété intellectuelle ou autres droits analogues identifiés lors de l'élaboration du document sont indiqués dans l'Introduction et/ou dans la liste des déclarations de brevets reçues par l'ISO (voir www.iso.org/brevets).

Les appellations commerciales éventuellement mentionnées dans le présent document sont données pour information, par souci de commodité, à l'intention des utilisateurs et ne sauraient constituer un engagement.

Pour une explication de la nature volontaire des normes, la signification des termes et expressions spécifiques de l'ISO liés à l'évaluation de la conformité, ou pour toute information au sujet de l'adhésion de l'ISO aux principes de l'OMC concernant les obstacles techniques au commerce (OTC), voir le lien suivant: [Avant-propos — Informations supplémentaires](http://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/4d511cc4-8444-41c6-a26d-d3011c52655c/iso-11731-2017).

Le présent document a été élaboré par le comité technique l'ISO/TC 147, *Qualité de l'eau*, Sous-comité SC 4, *Méthodes microbiologiques*.

Cette seconde édition de l'ISO 11731 annule et remplace les ISO 11731:1998 et ISO 11731-2:2004, qui ont fait l'objet d'une révision technique.

Introduction

Après la première épidémie reconnue de la maladie du légionnaire survenue en 1976, la bactérie isolée fut appelée *Legionella pneumophila*. Les *Legionella* sont largement présentes dans les environnements aquatiques naturels et artificiels, les sols, les composts et peuvent provoquer la légionellose. Les *Legionella* peuvent se développer par voie intracellulaire dans les protozoaires tels que *Acanthamoeba castellanii*, l'espèce *Hartmannella* ou l'espèce *Naegleria*. Au moins 61 différentes espèces de *Legionella* ont été décrites. Dans 26 de ces espèces, plusieurs souches infectieuses pour les humains ont été signalées. *Legionella pneumophila* peut être subdivisée en au moins 15 sérogroupes différents; neuf autres espèces peuvent également être subdivisées en au moins deux sérogroupes distincts. La surveillance des *Legionella* est importante pour des raisons de santé publique car elle permet d'identifier dans l'environnement les sources qui peuvent créer un risque de légionellose, telles que les tours de refroidissement, les systèmes de distribution d'eau chaude ou froide dans les bâtiments et les équipements associés tels que les bassins de spas, les unités dentaires, les appareils de climatisation, etc. La surveillance est également importante pour valider les mesures de contrôle et vérifier leur efficacité constante.

iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

[ISO 11731:2017](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/4d5f1cc4-844f-4fe6-a26d-d3011c32633c/iso-11731-2017)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/4d5f1cc4-844f-4fe6-a26d-d3011c32633c/iso-11731-2017>

Qualité de l'eau — Dénombrement des *Legionella*

AVERTISSEMENT — Il convient que les utilisateurs du présent document maîtrisent les pratiques courantes de laboratoire. Le présent document ne prétend pas couvrir tous les problèmes de sécurité potentiels associés à son utilisation. Il incombe à ses utilisateurs d'établir des pratiques appropriées en matière d'hygiène et de sécurité et de s'assurer de la conformité à la réglementation nationale en vigueur.

IMPORTANT — Il est absolument indispensable que les essais menés conformément au présent document le soient par du personnel dûment qualifié et compétent.

1 Domaine d'application

Le présent document spécifie des méthodes de culture pour l'isolement des *Legionella* et leur dénombrement dans des échantillons d'eau.

Ces méthodes sont applicables à tous les types d'échantillons d'eau, y compris les eaux potables, industrielles, usées et naturelles. Elles peuvent également être utilisées pour les matrices liées à l'eau (biofilms, sédiments, etc.).

Toutes les espèces de *Legionella* n'étant pas cultivables, les méthodes décrites dans le présent document peuvent ne pas retrouver la totalité des espèces de *Legionella*.

2 Références normatives

Les documents suivants cités dans le texte constituent, pour tout ou partie de leur contenu, des exigences du présent document. Pour les références datées, seule l'édition citée s'applique. Pour les références non datées, la dernière édition du document de référence s'applique (y compris les éventuels amendements).

ISO 3696, *Eau pour laboratoire à usage analytique — Spécification et méthodes d'essai*

ISO 7704, *Qualité de l'eau — Évaluation des membranes filtrantes utilisées pour des analyses microbiologiques*

ISO 8199, *Qualité de l'eau — Lignes directrices générales pour le dénombrement des micro-organismes sur milieu de culture*

ISO 11133, *Microbiologie des aliments, des aliments pour animaux et de l'eau — Préparation, production, stockage et essais de performance des milieux de culture*

ISO 19458, *Qualité de l'eau — Échantillonnage pour analyse microbiologique*

3 Termes et définitions

Pour les besoins du présent document, les termes et définitions suivants s'appliquent.

L'ISO et l'IEC tiennent à jour des bases de données terminologiques destinées à être utilisées en normalisation, consultables aux adresses suivantes:

— IEC Electropedia: disponible à l'adresse <http://www.electropedia.org/>

— ISO Online browsing platform: disponible à l'adresse <http://www.iso.org/obp>

3.1 Legionella
genre de micro-organismes normalement capables de croître sur gélose tamponnée au charbon actif et à l'extrait de levure (BCYE) contenant de la L-cystéine et des sels de fer

Note 1 à l'article: Voir l'[Annexe A](#) pour obtenir une description plus détaillée des espèces de *Legionella*.

4 Principe

4.1 Généralités

Selon l'origine et/ou les caractéristiques de l'échantillon, les *Legionella* présentes dans l'échantillon d'eau sont concentrées par filtration sur membrane, diluées ou directement ensemencées. Le niveau de détection souhaité peut varier en fonction de la législation (inter)nationale et de la raison de l'échantillonnage ou de l'étude. Les échantillons suspectés de contenir des *Legionella* en grand nombre, tels que ceux obtenus au cours d'études épidémiologiques, peuvent être traités avec et/ou sans étapes de concentration. Pour réduire le développement des bactéries non cibles concentrées et susceptibles d'interférer avec la récupération des *Legionella* cibles, des fractions des échantillons d'eau sont également soumises à un traitement thermique, à un traitement acide, ou à une combinaison des deux.

Une dilution est nécessaire dès lors qu'une forte concentration en *Legionella* et/ou d'autres bactéries est attendue. Il convient de traiter au préalable des fractions séparées de l'échantillon dilué: une première fraction étant soumise à un traitement thermique, une seconde à une solution d'acide ou, dans le cas d'échantillons fortement contaminés, à une combinaison d'une solution d'acide et d'un traitement thermique avant culture sur milieux sélectifs.

Les fractions traitées et/ou non traitées de l'échantillon sont transférées sur des boîtes du milieu de culture sélectif choisi pour les *Legionella*, et incubées.

NOTE Le traitement mécanique de l'échantillon peut améliorer la récupération des *Legionella*.

4.2 Examen

Après incubation, les colonies de morphologie caractéristique sur les milieux de culture sélectifs sont considérées comme des *Legionella* présomptives.

4.3 Confirmation

Les colonies présomptives sont confirmées comme étant des *Legionella* par repiquage afin de mettre en évidence leur besoin en L-cystéine et en fer(III) pour se développer.

NOTE Si l'identification des espèces et des sérotypes est demandée, des essais complémentaires sont requis (voir [Annexe G](#)). Ces essais ne sont pas inclus dans les méthodes normalisées décrites dans le présent document.

5 Appareillage et verrerie

Appareillage courant de laboratoire et notamment:

5.1 Boîtes de Petri stériles.

5.2 Étuve thermostatée, pouvant être maintenue à (36 ± 2) °C.

5.3 Lampe à ultraviolets, émettant une lumière d'une longueur d'onde de (360 ± 20) nm.

5.4 Appareillage de filtration sur membrane, permettant de filtrer des volumes d'eau de 10 ml à 1 000 ml.

5.5 Membrane filtrante.

5.5.1 Membrane filtrante pour concentration et élution, en polycarbonate ou en polyéthersulfone, d'un diamètre de 47 mm à 142 mm, avec des pores de dimension nominale 0,2 µm (voir Référence [6]). Ces types de membranes filtrantes sont utilisés pour la concentration suivie d'une procédure de lavage.

5.5.2 Membrane filtrante pour dépôt direct sur milieu de culture, en nitrate de cellulose ou en esters de cellulose mixtes, d'un diamètre de 47 mm à 50 mm, avec des pores de dimension nominale 0,2 µm ou 0,45 µm. Ces types de membranes filtrantes sont destinés à être directement placés sur les milieux de culture, après filtration. Avant leur utilisation, les filtres doivent être évalués conformément à l'ISO 7704.

NOTE Les membranes filtrantes foncées offrent un meilleur contraste des colonies de *Legionella* blanches que les membranes plus claires.

5.6 pH-mètre, d'une exactitude de $\pm 0,1$ de 20 °C à 25 °C.

5.7 Agitateur vortex.

5.8 Bain d'eau à ultrasons, permettant de s'assurer que le niveau de diluant qui recouvre la membrane filtrante est inférieur au niveau d'eau du bain.

5.9 Bain d'eau, pouvant être maintenu à (50 ± 1) °C.

5.10 Verrerie, stérilisée conformément à l'ISO 8199.

5.11 Microscope de dissection, stéréoscopique, permettant un grossissement d'au moins 4× et à éclairage incident oblique.

NOTE Une loupe simple (grossissement d'au moins 4×) peut également être utilisée.

5.12 Pince stérile, pour manipuler les membranes filtrantes.

NOTE Une pince à bouts arrondis est généralement utilisée pour éviter d'endommager les membranes au cours des manipulations.

5.13 Récipient stérile à bouchon à vis, avec ou sans billes de verre stériles. Pour extraire un maximum de *Legionella* de la membrane filtrante, des billes de verre stériles (diamètre de 2 mm à 3 mm) peuvent être ajoutées en quantité suffisante pour recouvrir le fond du récipient stérile.

6 Milieux de culture et réactifs

Sauf spécification contraire, utiliser des produits chimiques de qualité analytique pour la préparation des milieux de culture et des réactifs (voir Note). Préparer les milieux de culture et les réactifs conformément aux instructions des [Annexes B](#), [C](#) et [D](#). Préparer les milieux de culture en utilisant de l'eau distillée ou déminéralisée, exempte de substances susceptibles d'affecter la croissance des micro-organismes dans les conditions d'essai. L'eau doit être conforme aux exigences de l'ISO 3696, Qualité 3.

Il est également possible d'utiliser des milieux de culture et des réactifs disponibles dans le commerce, préparés et utilisés conformément aux instructions du fabricant.

NOTE D'autres qualités de produits chimiques peuvent être utilisées, sous réserve de démontrer qu'elles engendrent une performance égale pour l'essai.

6.1 Milieux de culture.

Voir l'[Annexe B](#).

6.1.1 Gélose tamponnée au charbon actif et à l'extrait de levure (BCYE).

Voir [B.1](#).

6.1.2 Gélose tamponnée au charbon actif et à l'extrait de levure sans L-cystéine (BCYE sans cys).

Voir [B.2](#).

NOTE La gélose BCYE sans cys peut être remplacée par de la gélose au sang (voir [B.6](#)), de la gélose nutritive (voir [B.7](#)) ou de la gélose tryptone-soja (voir [B.8](#)).

6.1.3 Gélose tamponnée au charbon actif et à l'extrait de levure avec suppléments sélectifs (BCYE+AB).

Voir [B.3](#).

6.1.4 Gélose à base de glycine, vancomycine, polymyxine B et cycloheximide (GVPC).

Voir [B.4](#).

6.1.5 Gélose de Wadowsky et Yee modifiée (MWY).

Voir [B.5](#).

ITih STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

6.2 Diluants.

Voir l'[Annexe C](#).

ISO 11731:2017
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/4d5f1cc4-844f-4fe6-a26d-d3011c32633c/iso-11731-2017>

6.2.1 Solution saline de Page.

Voir [C.1](#).

6.2.2 Solution de Ringer diluée.

Voir [C.2](#).

6.3 Solution d'acide.

Voir l'[Annexe D](#).

7 Échantillonnage

Procéder à l'échantillonnage, au transport et au stockage des échantillons conformément à l'ISO 19458. Ne pas exposer les échantillons à des conditions de température défavorables (gel ou traitement thermique excessif, par exemple).

NOTE Des récipients isolés peuvent s'avérer utiles à cet égard.

8 Mode opératoire

8.1 Échantillons

Du fait de la nature complexe des différentes matrices d'échantillons, le laboratoire doit déterminer la méthode appropriée à chaque type d'échantillon. L'[Annexe J](#) fournit une matrice de décision pour déterminer la méthode appropriée à appliquer. Elle décrit également les exigences associées et suggère des options supplémentaires.

Afin de garantir la détection des *Legionella* dans les échantillons d'eau, une méthode de concentration par filtration sur membrane (voir [8.2.2](#) ou [8.2.3](#)) sera requise dans la majorité des cas. Lorsque la concentration attendue de *Legionella* est supérieure à 10^4 unités formant colonie par litre (ufc/l), l'échantillon non concentré peut également être directementensemencé. Pour les échantillons fortement contaminés, diluer (voir l'[Annexe C](#) pour obtenir les diluants adaptés) et utiliser l'ensemencement direct avant et après le prétraitement (voir [8.3](#)). Noter les volumes d'échantillon dilués ou traités et le(s) prétraitement(s) appliqué(s).

Lorsque le nombre de *Legionella* dans un échantillon donné n'est pas connu, les méthodes de concentration sont généralement mises en œuvre. Par conséquent, suivre le mode opératoire décrit au [8.2.2](#) ou [8.2.3](#).

8.2 Concentration des échantillons d'eau

8.2.1 Généralités

Pour obtenir une description générale de la méthode de filtration sur membrane, voir l'ISO 8199. La filtration peut être effectuée sous vide ou par pression positive.

Il convient de régler le débit de façon à ne pas dépasser la valeur maximale spécifiée par le fabricant pour la taille ou le type du filtre.

NOTE Le mode opératoire pour les matrices liées à l'eau (écouvillons, sédiments, etc.) est décrit dans l'[Annexe I](#).

8.2.2 Filtration sur membrane et dépôt direct de la membrane filtrante sur milieu de culture

Filtrer l'échantillon d'eau (sans traitement, après traitement acide et, si nécessaire, après traitement thermique) sur une membrane filtrante en nitrate de cellulose ou en esters de cellulose mixtes ([5.5.2](#)). Le traitement acide peut également être directement effectué sur la membrane filtrante dans l'entonnoir (voir [8.3.2](#)). Le volume filtré dépend de la teneur en particules de l'eau ou du niveau de détection souhaité. Le volume filtré de l'échantillon doit être noté. Retirer soigneusement la membrane filtrante du support de filtration à l'aide d'une pince stérile ([5.12](#)) et la déposer (dessus vers le haut) directement sur le milieu de culture, en s'assurant qu'aucune bulle d'air ne soit piégée dessous.

NOTE Lorsque la concentration par filtration est impossible (par exemple en raison d'un niveau de dépôt élevé), l'échantillon peut être concentré par centrifugation (voir l'[Annexe F](#)).

8.2.3 Filtration sur membrane suivie d'une procédure de lavage

Filtrer l'échantillon d'eau sur une membrane filtrante en polycarbonate ou en polyéthersulfone ([5.5.1](#)). Le volume filtré dépend de la teneur en particules de l'eau ou du niveau de détection souhaité. Le volume filtré de l'échantillon doit être noté. Retirer la membrane filtrante du support de filtration à l'aide d'une pince stérile ([5.12](#)). Réaliser cette opération avec soin de manière à éviter la perte de dépôt résiduel. Placer la membrane filtrante (dessus vers le bas) dans un récipient stérile à bouchon à vis contenant ou non des billes de verre stériles ([5.13](#)). Pour détacher les micro-organismes de la membrane filtrante, ajouter 5 ml à 10 ml de diluant stérile (voir l'[Annexe C](#)) ou d'échantillon, et agiter vigoureusement en utilisant un agitateur vortex ([5.7](#)) pendant au moins 2 min. Une autre méthode consiste à placer le récipient ([5.13](#)) dans un bain d'eau à ultrasons ([5.8](#)) pendant une durée qui a été validée pour une

récupération maximale. S'assurer que le niveau de diluant qui recouvre la membrane est inférieur au niveau d'eau dans le bain d'eau à ultra-sons.

Ce concentré représente l'échantillon préparé. Noter le volume du concentré. Afin de faciliter l'éluion, les membranes filtrantes peuvent être coupées en plusieurs morceaux à l'aide de ciseaux stériles.

Diviser le concentré en trois portions. Utiliser une portion non traitée, une portion pour le traitement thermique (voir 8.3.1) et une portion pour le traitement à la solution d'acide (voir 8.3.2).

NOTE 1 La méthode de grattage ou de frottement peut également être utilisée pour détacher les bactéries de la membrane filtrante (voir l'Annexe E).

NOTE 2 Lorsque la concentration par filtration est impossible (par exemple en raison d'un niveau de dépôt élevé), l'échantillon peut être concentré par centrifugation (voir l'Annexe F).

NOTE 3 Une membrane filtrante supplémentaire peut être utilisée pour réaliser le prétraitement acide directement sur la membrane dans l'entonnoir.

8.3 Prétraitement de l'échantillon

8.3.1 Traitement thermique

Verser l'échantillon (concentré ou non) dans un récipient stérile et placer ce récipient dans un bain d'eau (5.9) à (50 ± 1) °C pendant (30 ± 2) min. Il convient d'utiliser de petits volumes (≤ 5 ml) afin de garantir un court laps de temps jusqu'à ce que la température souhaitée soit atteinte. Si de nombreux échantillons sont traités simultanément ou si des échantillons de gros volume sont traités ou si des récipients à paroi épaisse sont utilisés, surveiller la température dans un récipient séparé analogue à celui utilisé pour l'échantillon. La période de traitement débute dès que la température requise est atteinte. Après leur retrait du bain d'eau, il convient de refroidir les échantillons de gros volume ou les récipients à paroi épaisse afin d'éviter que le traitement thermique ne continue.

8.3.2 Traitement acide

Diluer un volume d'échantillon (concentré ou non) avec 9 volumes de solution d'acide (voir l'Annexe D), mélanger soigneusement et laisser en contact pendant $(5,0 \pm 0,5)$ min. Si l'échantillon dilué traité à l'acide est utilisé pour calculer la concentration finale des espèces de *Legionella* contenues dans cet échantillon, il convient de tenir compte du facteur de dilution. Des volumes supérieurs à 0,1 ml peuvent êtreensemencés afin de réduire la limite de détection.

Le traitement acide peut également être effectué directement sur la membrane filtrante dans l'entonnoir. Transvaser environ 30 ml de solution d'acide (voir l'Annexe D) sur la membrane filtrante. Laisser en contact pendant $(5 \pm 0,5)$ min et éliminer la solution d'acide par filtration. Laver la membrane filtrante avec au moins 20 ml du diluant (voir l'Annexe C). Il est important que le diluant ne rince pas la surface de l'entonnoir qui n'a pas été en contact avec la solution d'acide.

8.4 Culture

8.4.1 Généralités

Le choix de la méthode utilisée pour le dénombrement des espèces de *Legionella* dépend de l'origine/des caractéristiques de l'échantillon et de la raison de l'échantillonnage ou de l'étude. Une hypothèse doit être émise concernant la concentration attendue de micro-organismes interférents, en se basant sur l'expérience ou l'origine de l'échantillon. De plus, la limite inférieure de détection souhaitée doit être prise en compte. L'Annexe J détaille une matrice de décision permettant de choisir une méthode appropriée.

Selon le niveau de détection souhaité, il est possible d'utiliser plusieurs boîtes des différents milieux de culture mentionnés aux paragraphes suivants.

8.4.2 Échantillons ayant une forte concentration en *Legionella* et une faible concentration en micro-organismes interférents

Inoculer directement l'échantillon si le nombre attendu de *Legionella* dépasse 104 ufc/l. Inoculer et étaler 0,1 ml à 0,5 ml de l'échantillon sur une boîte de gélose BCYE (voir [B.1](#)) et sur une boîte de gélose BCYE+AB (voir [B.3](#)). Noter le volume inoculé.

8.4.3 Échantillons ayant une faible concentration en *Legionella* et une faible concentration en micro-organismes interférents

8.4.3.1 Dépôt direct de la membrane filtrante sur milieu de culture après filtration sur membrane

Filtrer l'échantillon (voir [8.2.2](#)) et placer la membrane filtrante non traitée directement sur une boîte de gélose BCYE (voir [B.1](#)). Les membranes filtrantes traitées à la solution d'acide selon [8.3.2](#) sont placées sur une ou plusieurs boîtes de géloses sélectives ou fortement sélectives BCYE+AB (voir [B.3](#)) ou GVPC (voir [B.4](#)) ou MWY (voir [B.5](#)).

8.4.3.2 Dépôt après filtration sur membrane suivi d'une procédure de lavage

Inoculer et étaler 0,1 ml à 0,5 ml de chaque portion concentrée de l'échantillon (non traitée, traitée thermiquement et traitée à l'acide) issue de la filtration sur membrane suivie d'une procédure de lavage (voir [8.2.3](#)) sur une boîte de gélose BCYE (voir [B.1](#)) et sur une ou plusieurs boîtes de géloses sélectives ou fortement sélectives BCYE+AB (voir [B.3](#)) ou GVPC (voir [B.4](#)) ou MWY (voir [B.5](#)). Noter le volume inoculé.

8.4.4 Échantillons ayant une forte concentration en micro-organismes interférents

Les échantillons ayant une forte concentration en micro-organismes interférents, sont mis en culture non concentrés (directs), concentrés (voir [8.2](#)) ou dilués (1:10). Diviser chaque sous-échantillon en trois portions. Une première portion est utilisée non traitée, une deuxième portion pour le traitement thermique (voir [8.3.1](#)) et une troisième portion pour le traitement à la solution d'acide (voir [8.3.2](#)). Inoculer et étaler 0,1 ml à 0,5 ml de chaque portion des sous-échantillons sur une boîte de gélose GVPC (voir [B.4](#)) ou une boîte de gélose MWY (voir [B.5](#)). Noter le volume inoculé.

8.4.5 Échantillons ayant une très forte concentration en micro-organismes interférents

Les échantillons ayant une très forte concentration en micro-organismes interférents, sont mis en culture non concentrés, et dilués (1:10 et 1:100) après un pré-traitement associé thermique et acide. Pour le traitement associé, procéder d'abord au traitement thermique (voir [8.3.1](#)) puis au traitement acide (voir [8.3.2](#)). Il est important de refroidir à température ambiante l'échantillon traité thermiquement avant de procéder au traitement acide. Préparer des dilutions directement après le traitement acide dans du diluant stérile (voir l'[Annexe C](#)).

Bien homogénéiser le mélange en utilisant un agitateur vortex ([5.7](#)) ou un bain d'eau à ultrasons ([5.8](#)). Si nécessaire, ajouter à l'échantillon une couche (quantité juste suffisante pour recouvrir le fond du récipient) de billes de verre stériles afin de faciliter la désagrégation du matériau. Inoculer et étaler 0,1 ml à 0,5 ml de chaque portion sur une boîte de gélose GVPC (voir [B.4](#)) ou une boîte de gélose MWY (voir [B.5](#)). Noter le volume inoculé.