



SERVICES CULTURE ÉDITIONS
RESSOURCES POUR
L'ÉDUCATION NATIONALE

**Ce document a été numérisé par le CRDP de Bordeaux pour la
Base Nationale des Sujets d'Examens de l'enseignement professionnel.**

Campagne 2013

BTS MÉTIERS DE L'EAU

BIOCHIMIE BIOLOGIE ET MICROBIOLOGIE DES EAUX – U .4

SESSION 2013

Durée : 4 heures

Coefficient : 4

L'usage de la calculatrice est interdit.

Tout autre matériel est interdit.

Dès que le sujet vous est remis, assurez-vous qu'il est complet.
Le sujet comporte 15 pages, numérotées de 1/15 à 15/15.

CONTAMINATION D'UN RÉSEAU D'EAU CHAUDE SANITAIRE PAR DES LÉGIONELLES

On suspecte une contamination par des légionelles du réseau d'eau chaude sanitaire d'un hôpital. L'objectif est de repérer la (ou les) portion(s) du réseau contaminée(s) et de procéder à la décontamination.

Pour l'utilisation de la norme AFNOR, on considère les **eaux chaudes sanitaires** comme des **eaux propres et filtrables** (voir définitions **eaux propres / eaux sales** en ANNEXE, page 9/15 « § 1. Domaine d'application »).

Le document n°1, page 5/15, présente une portion du réseau d'eau chaude sanitaire. Ce réseau alimente les salles d'eau de plusieurs chambres. L'étude porte sur quatre chambres (110, 111, 112 et 113) de l'aile ouest de l'hôpital.

La chambre 112, en réfection, est inoccupée depuis un mois.

1. Caractéristiques des légionelles (22 points)

Legionella est une bactérie de l'environnement présente sur tous les continents, mais dont l'isolement est plus fréquemment rapporté dans les pays industrialisés.

Legionella se retrouve dans les eaux de surface ainsi que dans les sources d'eau chaude, la terre et les composts. Les *Legionella* vivent à l'état libre dans l'environnement et certains protozoaires de type amibe peuvent présenter des vésicules intracellulaires dans lesquelles *Legionella* survit voire se multiplie.

Les bactéries du genre *Legionella* sont Gram négatives, non sporogènes, aérobies strictes, thermophiles avec un optimum de croissance compris entre 20 et 45°C.

L'espèce *Legionella pneumophila* est une bactérie pathogène opportuniste pouvant causer des infections chez l'homme.

1.1. Les étapes du protocole de la coloration de Gram sont les suivantes : sur un frottis fixé :

- cristal violet 1 minute ;
- lugol 1 minute ;
- rinçage alcool ;
- safranine 30 secondes.

Préciser le rôle de chacune de ces étapes.

1.2. **Préciser** les conditions d'utilisation du microscope pour l'observation microscopique du frottis coloré.

1.3. **Justifier** le résultat de la coloration de Gram de *Legionella*.

1.4. À l'aide du **document n°2 (page 6/15)** :

- **décrire** l'aspect microscopique de la bactérie ;
- **estimer** la longueur approximative en μm de cette bactérie.

1.5. **Comparer**, sous forme de tableau, la structure d'une cellule eucaryote (exemple amibe) et d'une cellule procaryote (exemple *Legionella*).

1.6. **Définir** l'expression « pathogène opportuniste ».

1.7. **Citer** le nom de la maladie causée par *L. pneumophila*.

1.8. **Indiquer** la voie de transmission à l'homme la plus probable.

2. Prélèvements et analyse des échantillons (34 points)

On réalise des prélèvements en différents points du réseau (**document n°1**). Ces points de prélèvement sont notés P1 à P6. La température au point de prélèvement P2 est de 48°C.

- 2.1. **Justifier** la localisation des 6 points de prélèvement.
- 2.2. **Indiquer** les différentes étapes du protocole d'échantillonnage à l'aide de l'extrait de la norme AFNOR NF T 90-431 + Amendement A1 (**ANNEXE, page 9/15 à 15/15**).
- 2.3. **Citer** tous les éléments composant le milieu GVPC utilisé pour l'ensemencement.
- 2.4. **Justifier** l'appellation « milieu sélectif enrichi » décrivant le milieu GVPC.
- 2.5. **Schématiser**, sous forme de diagramme, le mode opératoire de l'ensemencement, en précisant les conditions d'incubation (§ 8.1.1., 8.1.2. et 8.2. de la norme. On considère que l'eau analysée est un échantillon d'eau chaude sanitaire, donc d'eau propre et filtrable).

Les 6 prélèvements ont été analysés, les résultats sont consignés dans le **document n°3, page 6/15**.

- 2.6. **Calculer** pour chaque prélèvement le nombre de *L. pneumophila* par litre.

Il n'existe aucun texte réglementaire fixant une concentration maximale admissible en *Legionella* dans les réseaux de distribution d'eau chaude sanitaire. Le risque d'apparition de la maladie est très faible lorsque cette concentration est inférieure à 10^3 UFC/L.

- 2.7. **Commenter** les résultats précédents et préciser le ou les foyer(s) de prolifération.

3. Moyens de lutte contre la contamination du réseau (24 points)

- 3.1. **Citer** les trois mécanismes permettant aux légionelles de survivre voire proliférer dans un réseau d'eau chaude sanitaire.
- 3.2. **Reporter et compléter** sur la copie les légendes (ⓐ à ⓓ) du **document n°4 (page 7/15)**.
- 3.3. **Expliquer** le phénomène se déroulant en ⓐ du **document n°4**.
- 3.4. **Nommer et expliquer** le phénomène associé à la prolifération bactérienne en P1 et P5.

En cas de contamination par des légionelles, il faut rapidement procéder à un nettoyage suivi d'une désinfection du réseau.

Le nettoyage est pratiqué à l'eau :

- vitesse d'écoulement de $2,5 \text{ m.s}^{-1}$;
- régime turbulent (nombre de Reynolds de l'ordre de 10^4).

La désinfection est réalisée de deux façons :

- choc thermique en augmentant la température dans le ballon d'eau chaude sanitaire jusqu'à $70 \text{ }^\circ\text{C}$;
- choc chloré.

Cette dernière technique de traitement est retenue dans le cas étudié.

La chloration du réseau s'effectue par addition de chlore par piquage juste en amont de la pompe de circulation :

- $\rho_{\text{Cl}_2} = 100 \text{ mg.L}^{-1}$;
- temps de contact : 2 heures.

La chloration est suivie d'un rinçage et d'une vidange des canalisations.







- 3.5. Justifier** l'étape de nettoyage ainsi que les conditions dans lesquelles il est réalisé.
- 3.6.** En utilisant le **document n°5 (page 8/15)**, **préciser** la forme bactéricide ou active du chlore (formule chimique et nom) sachant que le pH de l'eau chaude sanitaire est de 7,5.
- 3.7.** En utilisant le **document n°5**, **calculer** la concentration en chlore actif de l'eau du réseau au cours de l'étape de désinfection.
- 3.8. Justifier** l'étape de rinçage du réseau.
- 3.9.** L'alternative à la chloration étant le choc thermique, **en justifier** les conditions opératoires.

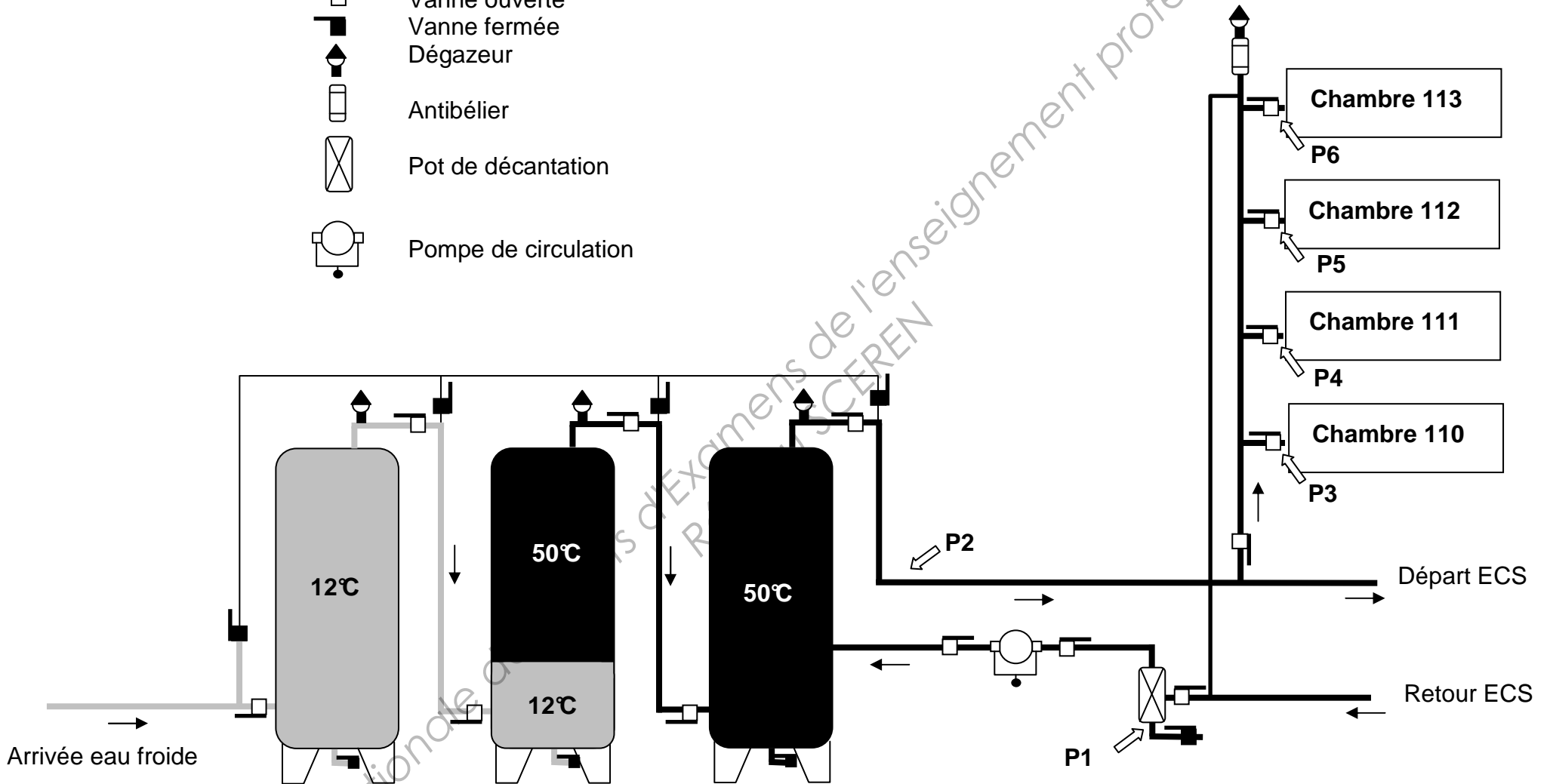
Trois jours après la décontamination du réseau, on effectue un dénombrement de *L. pneumophila* (**Document n°6, page 8/15**).

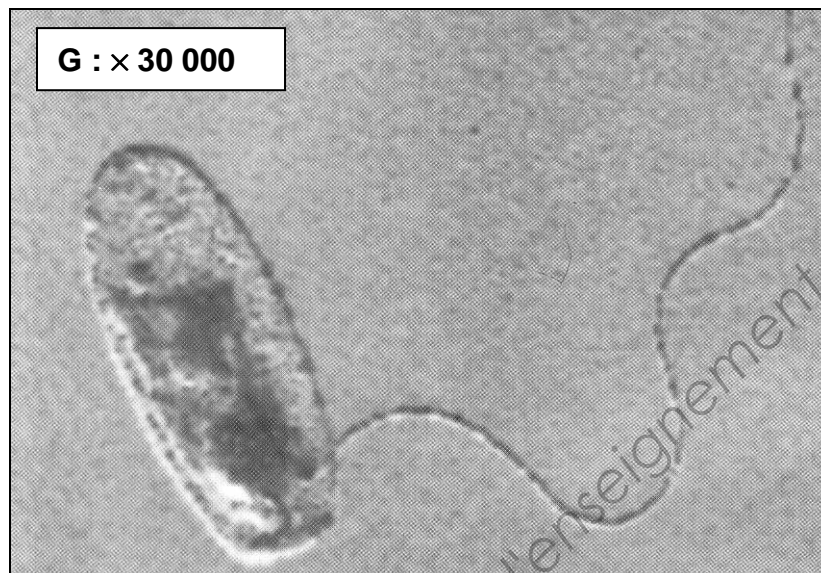
- 3.10. Conclure** sur l'efficacité de la décontamination et sur la qualité finale de l'eau du réseau d'eau chaude sanitaire.

Schéma simplifié du réseau d'Eau Chaude Sanitaire (ECS)

Légende :

-  Vanne ouverte
-  Vanne fermée
-  Dégazeur
-  Antibélier
-  Pot de décantation
-  Pompe de circulation

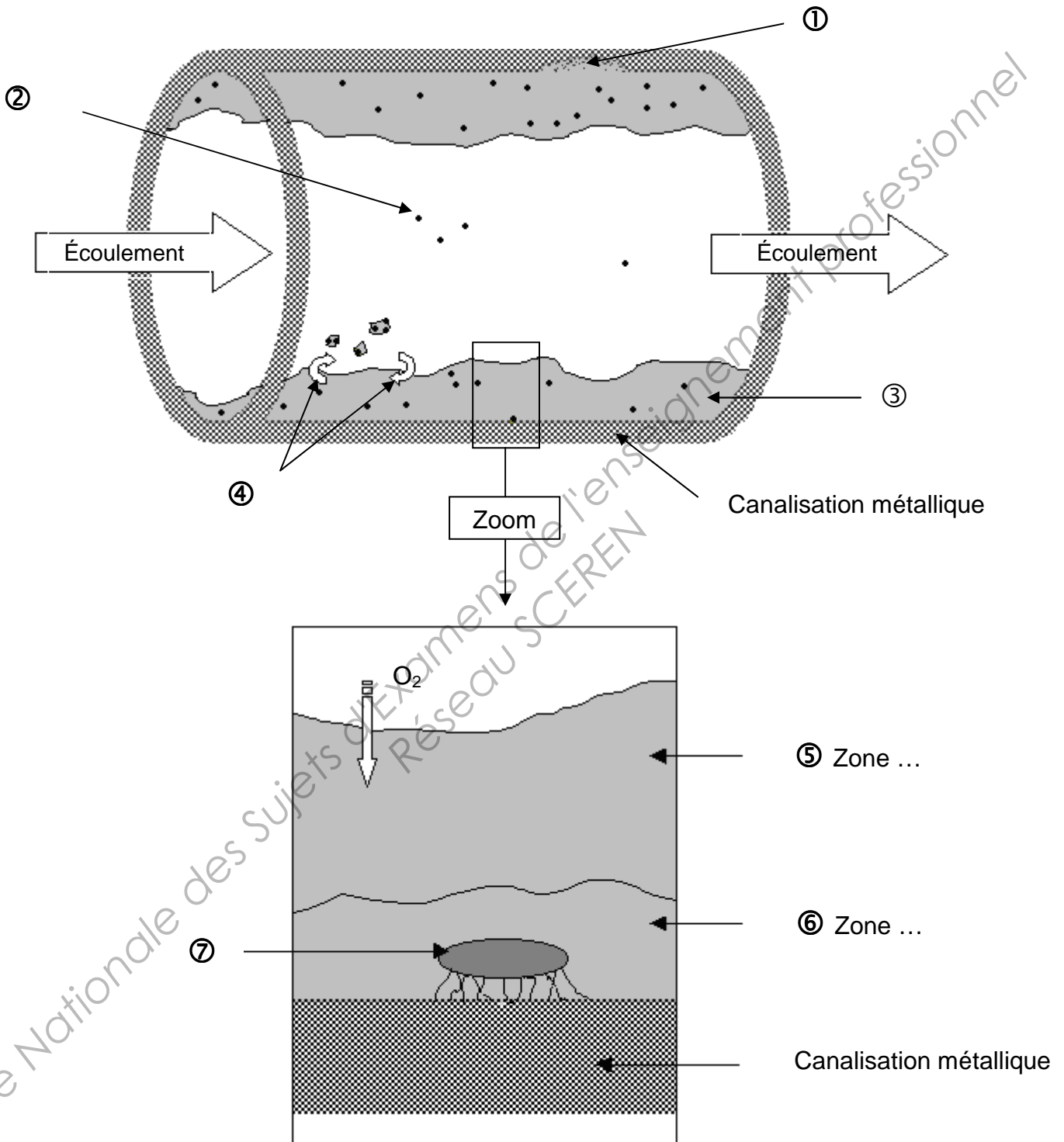


Document n°2**Électronographie de *Legionella pneumophila***
King's College – London – John Pacy**Document n°3****Résultats du dénombrement de *Legionella* et *L. pneumophila***
des 6 prélèvements (volume traité de 1 L)

Seuls sont donnés les résultats des dénombrements après ensemencements directs :

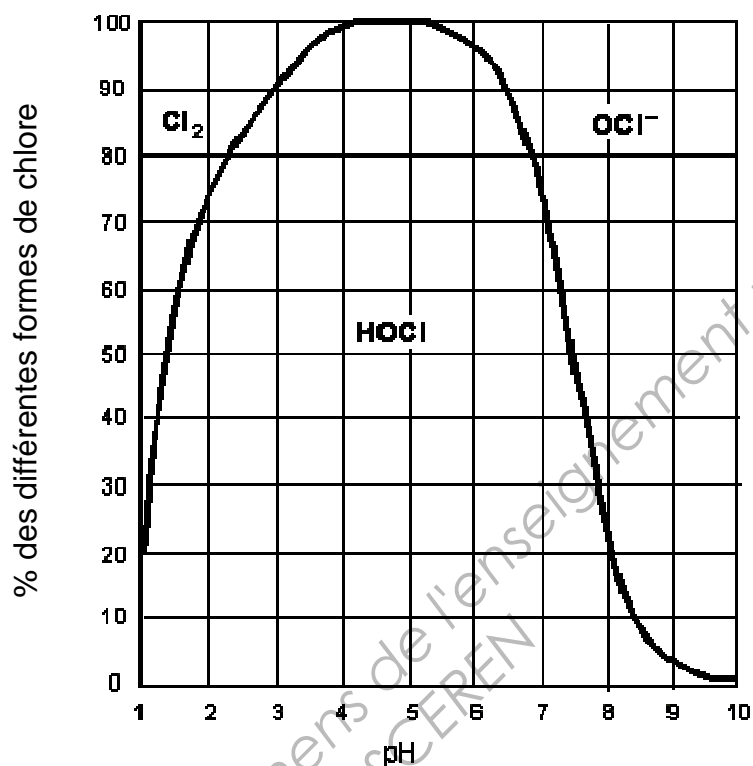
Prélèvements	P1	P2	P3	P4	P5	P6
Nombre de colonies confirmées en <i>Legionella</i> / boîte	192	5	5	5	12	5
Nombre de colonies confirmées en <i>L. pneumophila</i> / boîte	192	5	5	5	12	5

Schématisation du biofilm dans une canalisation



Document n°5

Les différentes formes du chlore en fonction du pH



Document n°6

Résultats du dénombrement de *L. pneumophila* de 3 prélèvements après désinfection

Numéro prélèvement	P1	P2	P5
UFC/Litre	< 250	< 250	< 250

ANNEXE

EXTRAIT DE LA NORME AFNOR NF T 90-431 (Septembre 2003) + AMENDEMENT A1 (Avril 2006) Recherche et dénombrement des *Legionella spp* et *Legionella pneumophila*

Méthode par ensemencement direct et après concentration par filtration sur membrane ou centrifugation

Remarque : [...] indique que des parties de la norme, non indispensables à la compréhension du sujet, ont été enlevées.

Avertissement

Les *Legionella* sont des bactéries de classe II. Elles sont susceptibles de causer des infections humaines par inhalation. Par conséquent, les manipulations suivantes doivent être effectuées par du personnel averti, avec toutes les précautions d'usage : travailler stérilement, éviter la formation d'aérosols, stériliser les déchets etc.

1. Domaine d'application

Le présent document spécifie une méthode d'isolement et de dénombrement de *Legionella* et *Legionella pneumophila* dans les eaux.

Cette méthode, faisant appel à un milieu sélectif, peut être appliquée à tous les types d'**eaux propres** (eaux destinées à la consommation humaine, **eaux chaudes sanitaires**, eaux minérales naturelles à usage thermal, eaux récréatives etc.) et sales (eaux industrielles, eaux naturelles etc.).

2. Références normatives

[...]

3. Termes et définitions

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

3.1. Définitions générales

3.1.1. *Legionella* : bactéries en bâtonnets, non sporogènes, à Gram négatives, aérobies, flagellées ou non, exigeantes en L-cystéine, caractérisées par leur richesse en acides gras ramifiés, propriété très inhabituelle pour les germes à Gram négatif. Certaines souches de cette bactérie pathogène opportuniste peuvent causer des infections chez l'homme (légionelloses).

3.1.2. *Legionella pneumophila* : *Legionella* répondant à la définition indiquée en 3.1.1., donnant une réaction positive en présence d'un sérum anti-*L. pneumophila*, et responsable de la plupart des cas de légionellose.

3.2. Définitions répondant aux besoins de la présente norme

3.2.1. *Legionella* : bactéries en bâtonnets capables de cultiver sur gélose tamponnée au charbon actif et à l'extrait de levure en 48 h minimum à 36°C uniquement en présence de L-cystéine .

3.2.2. *Legionella pneumophila* : microorganismes répondant à la définition indiquée en 3.2.1., non autofluorescents et donnant une réponse positive en présence d'anticorps anti-*L. pneumophila*.

4. Principe

La recherche des *Legionella* et des *Legionella pneumophila* dans les eaux comporte 6 étapes successives :

- ensemencement direct de l'échantillon sur milieu sélectif, et en parallèle, préparation d'un concentrat soit par filtration sur membrane en polycarbonate, avec remise en suspension par grattage ou par ultrasons ; soit par centrifugation avec reprise du culot dans un faible volume ;
- décontamination du concentrat obtenu, d'une part par traitement thermique, d'autre part par traitement acide, pour les eaux propres. [...];
- ensemencement du concentrat avant et après décontamination, sur milieu sélectif ;
- incubation pendant 8 à 10 jours à $(36 \pm 2)^\circ\text{C}$;
- repiquage des colonies typiques pour la recherche de bactéries exigeantes en L-cystéine et la mise en évidence des *Legionella* ;
- essai immunologique des colonies *Legionella* pour la recherche des *Legionella pneumophila* à l'aide d'anticorps spécifiques.

5. Échantillonnage

Les échantillons (volume 1 L) doivent être prélevés dans des récipients stériles avec toutes les précautions nécessaires (flamber et éliminer le premier jet, si l'on cherche à analyser la qualité du réseau en amont du point de prélèvement ; ne pas flamber ni éliminer le premier jet, si l'on cherche à connaître la qualité au point d'usage). La modalité du prélèvement doit figurer dans le rapport d'essai, si elle est connue.

Les échantillons prélevés doivent être remis au maximum le lendemain du prélèvement au laboratoire chargé des analyses. Dans le cas exceptionnel de remise des échantillons au laboratoire le surlendemain du prélèvement, ils doivent être transportés en emballage réfrigéré à $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$.

Dans le cas d'échantillons provenant d'eaux chlorées, bromées ou ozonées, le récipient collecteur doit de plus contenir du thiosulfate de sodium en quantité suffisante pour neutraliser les oxydants. Il doit être introduit stérilement après stérilisation du flacon, ou préalablement à celle-ci mais en tenant compte des pertes par oxydation.

D'autres produits biocides (bactéricides ou bactériostatiques) sont parfois utilisés, en particuliers dans les tours d'aéroréfrigération. Leur présence, qui peut conduire à une sous-estimation voire une inhibition de la culture des *Legionella*, doit donc être déclarée et figurer dans le rapport d'essai si elle est connue. Il n'est toutefois pas toujours possible de neutraliser ces produits.

Quels que soient les produits biocides présents, la durée écoulée entre la désinfection et le prélèvement est un paramètre important pour l'interprétation des résultats et doit également figurer dans le rapport d'essai si elle est connue.

6. Appareillage et verrerie

Matériel courant de laboratoire de microbiologie et notamment :

6.1. appareils pour la stérilisation en chaleur sèche (four) ou en chaleur humide (autoclave).

À l'exclusion du matériel livré stérile, particulièrement celui en plastique, la verrerie doit être stérilisée :

- soit au four, en la maintenant à une température de $(175 \pm 10)^\circ\text{C}$ pendant au moins 1 h.
- soit à l'autoclave, en la maintenant à une température de $(121 \pm 3)^\circ\text{C}$ pendant au moins 15 min ;

6.2. loupe binoculaire à éclairage latéral ;

6.3. étuve ou enceinte thermostatée réglée à $(36 \pm 2)^\circ\text{C}$, assurant une bonne répartition thermique et une humidité suffisante ;

BTS MÉTIERS DE L'EAU		Session 2013
Biochimie, biologie et microbiologie des eaux – U. 4	MTBBM	Page : 10/15

6.4. boîtes de Petri en verre ou en plastique, de capacité suffisante ;

6.5. appareils de filtration montés soit sur rampe spéciale soit sur fioles à vide ;

6.6. membrane filtrantes en polycarbonate, de diamètre moyen de pore 0,4 µm, d'environ 47 mm de diamètre ;

6.7. pinces permettant de saisir les membranes sans les altérer ;

6.8. pH-mètre ;

6.9. appareils de filtration à usage unique de diamètre moyen de pore 0,2 µm, soit complets, soit à monter sur seringue, pour fabrication du milieu de culture ;

6.10. lames de verre à puits pour immunofluorescence ;

6.11. microscope équipé pour la fluorescence [...] ;

6.12. générateur d'ultrasons ;

6.13. centrifugeuse permettant une accélération d'au moins 30 000 m.s⁻² et permettant de centrifuger au moins 500 mL dans des récipients à fond conique, de contenance 250 mL ou 500 mL ;

6.14. lampe de Wood à 366 nm.

7. Milieux de culture, diluant, sérums et souches.

7.1. Prescriptions générales

Les produits chimiques utilisés doivent être de qualité analytique. Préparer les milieux dans de l'eau purifiée conforme au paragraphe

4.4. de la norme NF T 90-461.

Les anticorps doivent être spécifiques. Dans les échantillons d'eaux, la possibilité de réactions croisées avec d'autres microorganismes est fréquente.

7.2. Diluant

7.2.1. Eau purifiée

Eau conforme au **paragraphe 4.4.** de la norme NF T 90-461.

7.2.2. Tampon pH 2,0

HCl 0,2 mol/L 1 mL
KCl 0,2 mol/L 18 mL
[...]

7.3. Milieux de culture

7.3.1. Milieu GVPC

7.3.1.1. Milieu de base pour BCYE α (Buffered Charcoal Yeast Extract α-ketoglutarate)

Composition :

- extrait de levure 10 à 12 g
- charbon actif pulvérulent 1,5 à 2 g
- tampon ACES 5 à 10 g
- α-cétoglutarate (sel de monopotassium) 1 g
- KOH 1M 40 mL
- Agar 12 à 17 g
- Eau purifiée (**7.2.1.**) 950 mL
[...]

7.3.1.2. Solution de L-cystéine

Composition :

- L-cystéine, HCl 0,40 g
- Eau purifiée (7.2.1.) 5 mL

[...]

7.3.1.3. Solution de pyrophosphate ferrique

Composition :

- pyrophosphate ferrique 0,25 g
- eau purifiée (7.2.1.) 5 mL

[...]

7.3.1.4. Solution d'antibiotiques et glycine

Composition :

- polymyxine B (sulfate) 80000 à 100000 UI
- vancomycine hydrochloride 1 mg
- cycloheximide 80 mg
- glycine (sans ammonium) 3 g
- eau purifiée (7.2.1.) 10 mL

[...]

Note : le cycloheximide est hépatotoxique. Des gants et un masque sont nécessaires lors de sa manipulation sous forme de poudre.

7.3.1.5. Milieu complet (GVPC) avec antibiotiques

Composition :

- milieu de base (7.3.1.1.) 990 mL
- solution de L-cystéine (7.3.1.2.) 5 mL
- solution de pyrophosphate ferrique (7.3.1.3.) 5 mL
- solution d'antibiotiques et glycine (7.3.1.4.) 10 mL

[...]

7.3.2. Milieu BCYE α sans L-cystéine

Composition :

- milieu de base (7.3.1.1.) 990 mL
- solution de pyrophosphate ferrique (7.3.1.3.) 5 mL

[...]

7.3.3. Milieu BCYE α sans antibiotique

Composition :

- milieu de base (7.3.1.1.) 990 mL
- solution de L-cystéine (7.3.1.2.) 5 mL
- solution de pyrophosphate ferrique (7.3.1.3.) 5 mL

[...]

7.3.4. Gélose au sang

7.3.4.1. Milieu de base

Composition :

- peptone tryptique de caséine 15 g
- peptone papainique de soja 5 g
- chlorure de sodium 5 g
- agar 15 g
- eau purifiée (7.2.1.) 1000 mL

[...]

7.3.4.2. Sang

On choisira, indifféremment, du sang défibriné stérile de cheval ou de mouton, vendu en ampoule scellée.

7.3.4.3. Milieu complet

Composition :

- milieu de base (7.3.4.1.) 1000 mL
- sang défibriné (7.3.4.2.) 50 mL

[...]

7.3.5. Gélose nutritive

Composition :

- peptone.....	5 g
- extrait de viande.....	1 g
- extrait de levure.....	2 g
- chlorure de sodium.....	5 g
- agar.....	15 g
- eau purifiée (7.2.1.).....	1000 mL
[...]	

7.3.6. Contrôle de qualité du milieu de culture

[...]

7.4. Pool de sérums anti-*Legionella pneumophila*

Utiliser un sérum polyclonal ou mieux, un anticorps monoclonal capable de réagir avec tous les sérogroupes connus de *Legionella pneumophila*.

7.5. Souches

7.5.1. *Legionella pneumophila* séro groupe 1 (ATCC 33152 ou CIP103854T).

7.5.2. *Pseudomonas fluorescens* (ATCC 13525 ou CIP69.13T).

8. Mode opératoire

8.1. Ensemencement

[...]

8.1.1. Ensemencement direct

Ensemencer 0,2 mL d'eau à analyser sur boîte de Petri (6.4.) contenant le milieu GVPC (7.3.1.5.).

[...]

Et préparer un concentrat par filtration (8.1.2.) ou par centrifugation (8.1.3.).

8.1.2. Concentration par filtration

Filtrer 1 L d'eau, ou dans le cas des eaux sales et/ou non filtrables 500 mL sur une ou plusieurs membrane(s) en polycarbonate (6.6.) puis :

- soit gratter la membrane dans 5 mL d'eau à analyser ou d'eau purifiée (7.2.1.) stérile en procédant de la façon suivante : la membrane est placée stérilement, face filtrante vers le haut dans un récipient stérile (par exemple, une boîte de Petri de 60 mm de diamètre) contenant 5 mL d'eau à analyser ou d'eau purifiée stérile. Elle est grattée au moyen d'un grattoir à cellules stérile, l'opération étant effectuée à 2 reprises au moins sur la surface totale de la membrane.

Si plusieurs membranes sont nécessaires, les gratter ensemble dans 5 mL d'eau à analyser ou d'eau purifiée (7.2.1.) stérile.

Ceci constitue le concentrat qui sera ensemencé sans et après traitement selon le protocole décrit en 8.1.4. ;

- soit placer au milieu d'une cuve à ultrasons un récipient contenant la membrane en polycarbonate immergée dans 5 mL d'eau. L'intérieur du récipient doit être sous le niveau d'eau de la cuve.

Si plusieurs membranes sont nécessaires, les placer ensemble dans 5 mL d'eau à analyser ou d'eau purifiée (7.2.1.) stérile.

Ceci constitue le concentrat qui sera ensemencé sans et après traitement selon le protocole décrit en 8.1.4.

[...]

8.1.3. Concentration par centrifugation (dans le cas des eaux sales et /ou non filtrables)

[...]

8.1.4. Ensemencement du concentrat

Ensemencer rapidement 0,1 mL du concentrat obtenu après filtration (8.1.2.) ou après centrifugation (8.1.3.) sur une boîte de milieu GVPC (7.3.1.5.).

Dans le cas des eaux chaudes sanitaires, ensemercer en plus 0,1 mL de la dilution au 1/10 en eau purifiée (7.2.1.) stérile sur une boîte de GVPC (7.3.1.5.).

Traiter une partie du concentrat restant par traitement acide et une autre par traitement thermique.

[...]

- Traitement thermique

Porter 1 mL de concentrat dans un tube stérile et placer ce tube dans un bain thermostaté à $(50 \pm 1)^\circ\text{C}$ pendant $30 \text{ min} \pm 1 \text{ min}$.

Ensemencer rapidement une boîte de milieu sélectif (7.3.1.5.) avec 0,1 mL d'échantillon traité par la chaleur.

- Traitement acide

Ajouter à 1 mL de concentrat, 1 mL de tampon acide (7.2.2.).

Après un temps de contact de $5 \text{ min} \pm 0,5 \text{ min}$, ensemercer rapidement 0,2 mL sur une boîte de milieu GVPC (7.3.1.5.) ou ensemercer rapidement 2 boîtes avec 0,1 mL par boîte de milieu sélectif.

[...]

8.2. Incubation

Retourner les boîtes ainsi préparées et les placer dans l'enceinte thermostatée (6.3.) à $(36 \pm 2)^\circ\text{C}$ durant 8 à 10 jours. Examiner les boîtes, au moins à 3 reprises, à partir de 3 à 4 jours jusqu'à la fin de la période d'incubation.

8.3. Dénombrement des *Legionella*

8.3.1. Repérage des colonies caractéristiques de *Legionella*

Sont considérées comme caractéristiques, les colonies qui présentent, après incubation à $(36 \pm 2)^\circ\text{C}$, une coloration générale

gris-bleu claire mais assez variable : parfois jaune, verte, blanche, marron, violette, rose.

Elles peuvent devenir blanchâtres en vieillissant, ont un bord plus ou moins net et rosé, et ont le plus souvent un aspect de verre fritté à la loupe binoculaire. Certaines sont fluorescentes sous lampe de Wood.

8.3.2. Évaluation du nombre de colonies caractéristiques à repiquer pour confirmation

- Distinguer les différents types de colonies caractéristiques présentes sur les boîtes (un type rassemble des colonies d'aspect morphologique similaire, et ayant un temps d'apparition identique). La lampe de Wood peut aider également à distinguer les différents types de colonies.

- Dénombrer les colonies caractéristiques par type (type a, type b, ... type x ...) et par boîte.

- Retenir pour les repiquages la boîte présentant le nombre total n de colonies caractéristiques ($n = n_a + n_b + \dots + n_x + \dots$) susceptible de fournir le résultat final conformément au chapitre 9. Dans le cas de paires de boîtes (ensemencement direct et avec dilution ou ensemencement du concentrat pur et dilué) toutes 2 exploitables, prendre en compte la moyenne pondérée des 2 boîtes pour déterminer le nombre de colonies caractéristiques.

En cas de colonies mal isolées, utiliser une autre boîte sur laquelle les colonies sont suffisamment isolées.

- Si $1 \leq n \leq 5$, repiquer toutes les colonies de cette boîte.

- Si $n > 5$, repiquer au minimum 5 colonies de cette boîte (si plusieurs types sont présents, repiquer au minimum 2 colonies de chaque type lorsque $n_x > 1$).

- Repiquer, par ailleurs, des colonies appartenant à des types caractéristiques non présents sur la boîte retenue initialement pour les repiquages (repiquer au minimum 2 colonies de chacun de ces types lorsque $n_x > 1$).

[...]

8.3.3. Confirmation et dénombrement des *Legionella*.

Repiquer les colonies caractéristiques dans l'ordre suivant, sur :

- gélose BCYE α sans L-cystéine (7.3.2.) ;
- gélose au sang (7.3.4.) ou gélose nutritive (7.3.5.) ;
- gélose BCYE α avec L-cystéine (7.3.3.).

Incuber à (36 \pm 2)°C pendant au moins 48 heures et lire entre 2 et 4 jours.

La présence de culture sur gélose au sang (7.3.4.) ou gélose nutritive (7.3.5.) et/ou gélose BCYE α sans L-cystéine (7.3.2.) infirme la présence de *Legionella*.

Sont considérées comme *Legionella* toutes les colonies présentant un aspect caractéristiques et ne cultivant que sur milieu BCYE α avec L-cystéine (7.3.3.).

8.4. Dénombrement des *Legionella pneumophila*

Tester, en vue de la confirmation de l'espèce *L. pneumophila*, toutes les colonies repiquées confirmées comme *Legionella* (8.3.3.) non fluorescentes sous lampe de Wood. Tester en parallèle les souches de contrôle positif (7.5.1.) et négatif (7.5.2.). Utiliser pour les tests les cultures obtenues après repiquage sur milieu BCYE α avec L-cystéine (7.3.3.).

Sont considérées comme *L. pneumophila*, les colonies précédentes qui sont non fluorescentes sous lampe de Wood et donnent une réaction positive en immunofluorescence ou en agglutination au latex en présence d'anticorps anti-*L. pneumophila*.

Se conformer aux indications du fabricant pour réaliser les tests immunologiques.

[...]

9. Expression des résultats

Par convention, chaque colonie est considérée comme ayant été engendrée par un microorganisme.

L'ensemble des résultats doit être exprimés sous la forme :

- *Legionella* UFC/Litre ;
 - dont *L. pneumophila* UFC/Litre ;
- et en gardant au maximum 2 chiffres significatifs.

[...]

9.1. Considérer d'abord la ou les 2 boîtesensemencées en direct.

Dans le cas où la boîte ou les boîtesensemencées en direct (8.1.1.) fournissent des nombres exploitables ($n \geq 5$) de *Legionella* et/ou de *L. pneumophila* confirmées, exprimer le résultat de *Legionella* et *L. pneumophila* comme décrit ci-après en 9.1.1.

[...]

9.1.1. Pour les eaux propres

Si la boîte fournit un nombre exploitable ($n \geq 5$) de colonies de *Legionella* et/ou de *L. pneumophila* confirmées, calculer le résultat de la façon suivante :

$$N = n \times 1000 / 0,2$$

$$\text{Soit } N = n \times 5000 \text{ UFC/L}$$

[...]