



**LAB'EAU-AIR-SOL**  
**(9087-4405 QUÉBEC INC.)**

**86, RUE DE LA VISITATION,  
SAINT-CHARLES-BORROMÉE, J6E 4M8  
TÉL. 450-755-5575  
1-877-755-5576  
FAX. 450-759-1107**

**MÉTHODES D'ÉCHANTILLONNAGE**

Adressées aux investigateurs certifiés

Échantillon de Légionnelle

**Méthode : M-EC-11-18**

Version 18  
5 janvier 2016

## 1. Principe de la méthode

La méthode permet le dénombrement et l'identification de bactéries *Legionella*. Les échantillons d'eau proviennent des tours de refroidissement, des douches ou de tout autre endroit permettant la croissance des bactéries recherchées.

L'analyse se fait par croissance sur gélose BCYE, avant ou après dilution ou concentration par filtration. Les échantillons peuvent aussi être traités à la chaleur pour réduire le nombre de bactéries interférentes.

## 2. Interférences

Le genre *Legionella* peut être difficile à faire pousser sur pétri. De plus, le repiquage est essentiel pour la confirmation, ainsi qu'un test d'agglutination pour l'identification à l'espèce. La présence d'autres bactéries peut interférer avec la croissance de *Legionella*, principalement *Pseudomonas*, et doit être notée sur le rapport, de même que l'utilisation d'un traitement thermique. Tous deux sous-estiment la concentration de *Legionella*. L'ensemencement doit se faire dans un délai maximal de 48 h suivant le prélèvement.

## 3. Échantillonnage

### 3.1 Termes et définitions

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

Eaux d'agrément : Eau servant aux loisirs (par exemple une piscine) ou à un effet décoratif (par exemple une fontaine).

Échantillon : volume global d'eau représentatif de l'eau à contrôler, prélevé en un endroit défini selon des modalités définies et destiné à la réalisation d'analyses (physico-chimiques, biologiques, microbiologiques et radiologiques). L'échantillon prélevé peut correspondre en pratique, selon les analyses à réaliser, à un ou à plusieurs flacons conditionnés selon des modalités spécifiques définies.

Fiche de prélèvement : document renseigné par le préleveur pour assurer la traçabilité complète des conditions de prélèvement et celle des mesures in situ.

Flambage : action consistant à porter le matériau d'un point de prélèvement à une température élevée à l'aide d'une flamme (flambeur) afin d'assurer sa désinfection.

Prélèvement de chimie : prélèvement et conditionnement d'un échantillon d'eau pour la réalisation d'analyses physico-chimiques et/ou radiologiques.

Prélèvement de microbiologie : prélèvement et conditionnement d'un échantillon d'eau pour la réalisation d'analyses microbiologiques et/ou biologiques.

IRDEFA : installation de refroidissement par dispersion d'eau dans un flux d'air. Installation généralement équipée de tours aéroréfrigérantes humides.

T.A.R. : Tour aéroréfrigérante humide

ECS : eau chaude sanitaire

### 3.2 Recommandations générales

Il est important que les échantillons soient prélevés dans des contenants stériles. Si l'échantillon contient du chlore et/ou du bromure ou tout autre biocide, du thiosulfate de sodium doit être ajouté pour une concentration finale de 200 mg/L. Si le prélèvement suit un traitement-choc, il doit se faire au minimum 48 h après celui-ci. Les points où les conditions sont instables ne devraient pas servir à l'échantillonnage. Les échantillons doivent être protégés des températures extrêmes. Ils sont idéalement maintenus entre 6°C et 20 °C durant le transport. Des refroidisseurs (ice-pack) seront fournis pour la saison chaude. Lors de l'échantillonnage, laissez refroidir l'eau à température ambiante avant de les mettre avec les refroidisseurs.

La personne effectuant le prélèvement doit avoir les mains propres. Les nettoyer, si nécessaire, avant de faire le prélèvement, soit à un robinet, soit avec des lingettes désinfectantes (éthanol 70%) et procéder de manière à éviter toute contamination de l'échantillon. Elle doit aussi porter un masque de protection de type P100 pour sa propre protection.

Un volume d'un (1) litre est recueilli en prenant soin de conserver le thiosulfate de sodium déjà présent dans la bouteille et en laissant un volume d'air dans le flacon pour permettre une agitation correcte avant l'analyse (environ 2,5 cm).

Ouvrir le flacon avant le prélèvement et poser le bouchon à l'envers ou le tenir sans poser les doigts à l'intérieur; ensuite, fermer le flacon et l'essuyer.

Photographier le point de prélèvement et autre élément pertinent.

Les échantillons doivent parvenir au laboratoire le plus rapidement possible, dans un délai maximal de 48 heures. Ils doivent être conservés à température de la pièce, ou en cas de grosse chaleur, plus de 25°C, transportés avec des « ice pack » emballés.

### **3.3 Recommandations concernant la purge et la désinfection du point de prélèvement**

Le prélèvement de microbiologie pour recherche de *Legionella* peut avoir deux types d'objectifs :

- Contrôler la qualité microbiologique d'une eau (eaux de réseau, froides ou chaudes, eaux d'agrément ou eaux naturelles, etc.) ;
- Contrôler le risque pour la santé publique présenté par le point de prélèvement.

Dans le premier cas, une purge et une désinfection préalable sont nécessaires, mais pas dans le deuxième cas. Le Tableau 1, ci-dessous, récapitule les différents types de cas et la conduite à tenir en matière de purge et de désinfection avant prélèvement.

#### 3.3.1 Désinfection du point de prélèvement :

- Le flambage est recommandé comme moyen de désinfection, sauf dans les cas bien identifiés où la flamme présente un risque pour la sécurité des installations ou des personnes ;
- Dans certains cas (robinet à cellules photo-électriques, col de cygne en plastique, ou environnement potentiellement dangereux) il est conseillé de désinfecter à l'aide d'un désinfectant adéquat, comme de l'éthanol 70%.
- Noter sur la fiche de prélèvement si le point de prélèvement a été désinfecté par flambage ou avec une autre méthode.

#### 3.3.2 Processus de désinfection d'un robinet, d'une vanne ou d'un point de purge

- 1) Fermer le robinet (démonter éventuellement les accessoires présents) ;

- 2) désinfecter en utilisant le flambage (ou les lingettes désinfectantes à l'éthanol 70%, par exemple, en laissant agir au moins 30 secondes);
- 3) ouvrir le robinet et faire couler ensuite l'eau (au moins 30 secondes), pour refroidir le robinet en cas de flambage ou pour éliminer les traces de désinfectant ;
- 4) procéder aux prélèvements d'eau (sans modifier l'écoulement au point de prélèvement).

Tableau 1 — Conduite à tenir, selon les cas, en matière de purge et de désinfection avant prélèvement

CAS ENVISAGE	Purge	Désinfection du point de prélèvement	Remarques
<i>Réseau d'eau froide :</i>			
— Point de suivi réseau	Oui	Oui	
— Point de distribution	Non	Non	Douche ou douchette
<i>Réseau ECS non bouclé :</i>			
— Point de suivi réseau	Oui	Oui	Si possible, purge de l'unité de production ou de stockage
— Point de distribution	Non	Non	Douche ou douchette
<i>Réseau ECS bouclé :</i>			
— Point de suivi réseau	Oui	Oui	Retour de boucle
— Point de distribution	Non	Non	Douche ou douchette
<i>Eaux d'agrément et eaux naturelles</i>	Non	Non	
<i>IRDEFA :</i>			
— Eau d'appoint	Conseillée	Oui	Sur un point en amont de TAR
— Eau du bac de reprise	Non	Non	Si échantillonné dans le bassin
— Point du circuit	Conseillée	Oui	Si vanne de prélèvements

#### 4. Matériel

- Désinfectant (éthanol 70%);
- Désinfectant pour les mains et papier essuie-mains;
- Masque de protection de type P100;
- Gants à usage unique;
- Chalumeau à gaz avec recharges;
- Briquet;
- Marqueurs, stylos, étiquettes;
- Clés à molette;
- Glacière avec blocs réfrigérants;
- Thermomètre;
- Flacons stériles d'un (1) litre avec thiosulfate de sodium.

## 5. Recommandations pour la protection des agents de prélèvement

Pour les prélèvements sur les installations de refroidissement par dispersion d'eau dans un flux d'air (IRDEFA), la personne chargée du prélèvement doit porter un masque de protection filtrant au moins 99,95 % des particules en suspension (Type P100), des gants à usage unique (si le prélèvement se fait par immersion manuelle au niveau d'un bac de rétention), des lunettes de sécurité anti-éclaboussures et un vêtement de protection. De plus, il doit être accompagné d'une personne habilitée à effectuer des opérations sur l'installation.

## 6. Recommandations concernant la traçabilité des opérations

Tous les flacons prélevés doivent être clairement identifiés dès leur prélèvement. Il est important pour l'interprétation ultérieure des résultats d'analyses et pour assurer la validité du prélèvement que la traçabilité des opérations soit complète.

Le préleveur doit compléter une fiche de prélèvement autorisée par Lab'eau-air-sol (annexe 1). Celle-ci assure la traçabilité des opérations de prélèvement. Cette fiche complétée doit être annexée au rapport de résultats pour permettre à l'entité responsable de produire un rapport d'entretien ou autre, d'avoir tous les détails nécessaires.

## 7. Recommandations concernant les modalités de prélèvement et le choix du point de contrôle des réseaux d'eau

**7.1 Les points techniques** (sortie de production d'eau chaude, vanne de sortie d'eau du générateur, vanne du retour de boucle, vanne de pied de colonne, partie basse du ballon ; aval du compteur)

- Vannes de sortie d'eau de générateur, de retour de boucle, de pied de colonne, etc. : flamber et faire couler 2 à 3 minutes avant prélèvement afin de réduire la contamination périphérique.
- Partie basse du ballon : faire couler l'eau abondamment pour chasser les dépôts de la canalisation d'évacuation (faire en sorte de ne pas prélever l'eau froide d'alimentation).

**7.2 Les points d'usages** (par exemple les robinets et pommes de douche)

Suivant le type de contrôle des points d'usages, les modalités de prélèvement diffèrent :

- Contrôle de l'exposition : le prélèvement s'effectue au 1er jet sans démontage de mousseur ni de pomme de douche et sans

flambage.

- Contrôle des conditions de maîtrise du réseau : Le prélèvement est réalisé après écoulement de 2 à 3 minutes (température de l'eau stable) de façon à recueillir l'eau de l'amont. Pour l'eau froide, ne pas prélever à un robinet mélangeur ou mitigeur pour éviter d'entraîner la flore périphérique. Pour l'eau chaude penser à fermer l'arrivée d'eau froide s'il s'agit d'un mitigeur.

### **7.3. Eaux d'agrément et eaux naturelles**

#### **7.3.1 Eaux d'agrément**

Pour le prélèvement procéder conformément à la partie «eaux de baignade» du guide technique FD T 90-521 — Qualité de l'eau — Guide technique pour le suivi sanitaire des eaux piscines et baignades.

#### **7.3.2 Eaux de fontaines et brumisateurs**

Pour le prélèvement procéder conformément à ce qui est recommandé pour le prélèvement sur un écoulement en continu à la ressource dans le guide technique FD T 90-520 — Qualité de l'eau — Guide technique pour le suivi sanitaire des eaux de distribution publique.

#### **7.3.3 Eaux naturelles**

Pour le prélèvement procéder conformément à ce qui est recommandé pour le prélèvement à la ressource dans le guide technique FD T 90-520 - Qualité de l'eau — Guide technique pour le suivi sanitaire des eaux de distribution publique.

### **7.4 Installations de refroidissement par dispersion d'eau dans un flux d'air**

Choix du point de contrôle : Le prélèvement est réalisé sur un point du circuit d'eau de refroidissement où l'eau est représentative de celle en circulation dans le circuit et hors de toute influence directe de l'eau d'appoint. À défaut de point parfaitement défini, le point de prélèvement peut être situé en amont de la dispersion d'eau ou dans le bac de la tour si des mesures de conductivité montrent que l'eau de ce bac est représentative de l'eau en circulation dans l'installation. Dans ce cas, le rapport de conductivité entre l'eau de la tour et l'eau d'appoint, pour une eau représentative de l'eau en circulation est généralement compris entre 2 et 5.

S'il était impossible de prélever l'échantillon dans le bassin, l'échantillon pouvait être recueilli au niveau de la vanne de purge

préalablement désinfectée. Il fallait laisser couler l'eau pendant une minute et prélever l'échantillon en évitant de toucher la vanne avec la bouteille d'échantillons.

Au besoin, plusieurs échantillons peuvent être prélevés à des points d'échantillonnage différents, pour permettre la comparaison des résultats.

*Comment procéder :*

- Demander au technicien habilité à effectuer des opérations sur l'installation d'éteindre le système de refroidissement et d'ouvrir la lucarne donnant accès au bac de la tour.
- Plonger un flacon d'un litre contenant du thiosulfate de sodium à l'horizontale (en évitant le déversement du thiosulfate). Le redresser jusqu'à ce que le volume d'eau recueilli soit suffisant tout en gardant un volume d'air dans le flacon pour permettre une agitation correcte avant l'analyse (environ 2,5 cm).

## **8. Recommandations concernant les mesures *in situ***

La traçabilité des appareils utilisés pour les mesures *in situ* doit être assurée. Noter sur la feuille de prélèvements tous les résultats des mesures *in situ* et les constatations pertinentes.

### **8.1 Eaux de réseaux et eaux d'agrément ou de baignades**

- Température : à mesurer toujours *in situ* – Désinfecter le thermomètre et prendre la température de l'eau dans le flacon ;
- pH : à mesurer *in situ* si l'eau est instable ;
- aspect de l'eau et couleur du dépôt : évaluation qualitative effectuée *in situ* par le préleveur. Cette mesure a pour but de signaler toute anomalie flagrante en matière d'aspect de l'eau et de couleur du dépôt (si présence d'un dépôt). En cas de résultats anormaux, faire des commentaires sur la fiche de prélèvement ;
- chlore résiduel (libre et/ou total) : pour les eaux de distribution publique, effectuer la mesure *in situ* de la teneur en chlore résiduel.

### **8.2 Installation de refroidissement à dispersion d'eau dans un flux d'air**

- Température : à mesurer toujours *in situ* ;
- pH : à mesurer *in situ* ou en laboratoire ;
- conductivité : à mesurer *in situ* ou en laboratoire ;
- turbidité : à mesurer *in situ* ou en laboratoire ;
- aspect de l'eau et couleur du dépôt : évaluation qualitative effectuée *in situ* par le préleveur. Cette mesure a pour but de



signaler toute anomalie flagrante en matière d'aspect de l'eau et de présence éventuelle d'un dépôt (en noter la couleur). En cas de résultats anormaux, commenter sur la fiche de prélèvement ;

- chlore résiduel (libre et/ou total) : à mesurer *in situ* si l'eau du circuit et/ou l'eau d'appoint font l'objet d'une désinfection récente par des produits chlorés ou bromés.

## 9. Recommandations concernant le transport des échantillons

Il est important de se conformer aux considérations générales suivantes sur le transport des échantillons au laboratoire.

### 9.1 Délais

- Les flacons doivent être amenés au laboratoire le plus rapidement possible ;
- le délai maximal de conservation de l'échantillon entre le prélèvement et l'analyse est de 48 heures.
- les échantillons prélevés doivent parvenir au laboratoire au plus tard normalement le lendemain du prélèvement et à titre exceptionnel au maximum le surlendemain du prélèvement ;

### 9.2 Températures

- Utiliser des enceintes isothermes propres pour ramener tous les échantillons au laboratoire ;
- pour limiter le développement de la flore interférente, il est recommandé de transporter les flacons dans une enceinte ayant la capacité de maintenir une température de 20 °C ± 3 °C et à l'abri des rayonnements solaires, sauf pour les eaux chaudes qu'il est recommandé de laisser refroidir à température ambiante ;

Si le délai entre le prélèvement et l'arrivée au laboratoire est supérieur à 24 heures, le transport des flacons dans une enceinte ayant la capacité de maintenir une température de 20 °C ± 3 °C et le contrôle de la température de l'enceinte sont obligatoires.

En cas de grosse chaleur, plus de 25°C, les échantillons doivent être transportés avec des « ice pack » emballés.



**Christian L Jacob**  
*M.Sc., Mcb.A.*