NORME INTERNATIONALE

ISO 11731

Deuxième édition
2017-05

Qualité de l'eau — Dénombrement des *Legionella*

Water quality — Enumeration of Legionella

Numéro de référence
ISO 11731:2017(F)

© ISO 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 Milieux 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 *Legionella* et une faible concentration en micro-organismes interférents 7
8.4.3 Échantillons ayant une faible concentration en *Legionella* 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 *Legionella* 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 *Legionella* ***10***
11.3 Préparation de la culture de travail et de la suspension pour les essais de performance 10
Annexe A (informative) **Espèces de *Legionella*** **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**

© ISO 2017 – Tous droits réservés

Annexe F (informative) **Technique de centrifugation** **23**
Annexe G (informative) **Technique des anticorps par immunofluorescence indirecte pour l'identification des espèces de *Legionella*** **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**

 © ISO 2017 – Tous droits réservés

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.

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.

© ISO 2017 – Tous droits réservés

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.

© ISO 2017 – Tous droits réservés

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

© ISO 2017 – Tous droits réservés

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.

© ISO 2017 – Tous droits réservés