

# NF T90-431

AOÛT 2017

[www.afnor.org](http://www.afnor.org)



**DOCUMENT PROTÉGÉ  
PAR LE DROIT D'AUTEUR**

Droits de reproduction réservés. Sauf prescription différente, 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 et les microfilms, sans accord formel.

Contact :  
AFNOR – Norm'Info  
11, rue Francis de Pressensé  
93571 La Plaine Saint-Denis Cedex  
Tél : 01 41 62 76 44  
Fax : 01 49 17 92 02  
E-mail : [norminfo@afnor.org](mailto:norminfo@afnor.org)

**afnor**

Ce document est à usage exclusif et non collectif des clients AFNOR.  
Toute mise en réseau, reproduction et rediffusion, sous quelque forme que ce soit, même partielle, sont strictement interdites.

This document is intended for the exclusive and non collective use of AFNOR customers.  
All network exploitation, reproduction and re-dissemination, even partial, whatever the form (hardcopy or other media), is strictly prohibited.

AFNOR

Pour : AFNOR

le : 06/09/2017 à 11:58

Diffusé avec l'autorisation de l'éditeur

Distributed under licence of the publisher



# norme française

**NF T 90-431**  
**26 Août 2017**

Indice de classement : **T 90-431**

**ICS : 07.100.20**

## **Qualité de l'eau — Recherche et dénombrement de *Legionella* spp et de *Legionella pneumophila* — Méthode par ensemencement direct et après concentration par filtration sur membrane ou centrifugation**

E : Water quality — Detection and enumeration of *Legionella* spp  
and *Legionella pneumophila* — Method by direct inoculation  
and after concentration by membrane filtration or centrifugation

D : Wasserbeschaffenheit — Nachweis und Zählung von *Legionella* spp  
und von *Legionella pneumophila* — Verfahren durch direkte Beimpfung  
und nach Konzentration durch Membranfiltration oder Zentrifugation

### **Norme française homologuée**

par décision du Directeur Général d'AFNOR.

Remplace la norme homologuée NF T 90-431, de novembre 2014.

### **Correspondance**

À la date de publication du présent document, il n'existe pas de travaux de normalisation internationaux ou européens traitant du même sujet.

### **Résumé**

Le présent document spécifie une méthode d'isolement et de dénombrement des *Legionella* dont *Legionella pneumophila* dans les eaux. Cette méthode faisant appel à un milieu sélectif peut être appliquée à tous les types d'eaux : eaux destinées à la consommation humaine, eaux chaudes sanitaires, eaux minérales naturelles à usage thermal (définies comme eaux propres), eaux récréatives, eaux industrielles, eaux d'installation de refroidissement par dispersion d'eau dans un flux d'air (IRDEFA), eaux naturelles (définies comme eaux sales).

### **Descripteurs**

**Thésaurus International Technique** : eau, qualité, essai des eaux, pollution de l'eau, analyse microbiologique, recherche, comptage des bactéries, bactérie, bactérie aérobie, filtration, milieu de culture, échantillonnage, méthode par centrifugation.

### **Modifications**

Par rapport au document remplacé, révision de la norme.

### **Corrections**

## La norme

**La norme** est destinée à servir de base dans les relations entre partenaires économiques, scientifiques, techniques et sociaux.

La norme par nature est d'application volontaire. Référencée dans un contrat, elle s'impose aux parties. Une réglementation peut rendre d'application obligatoire tout ou partie d'une norme.

**La norme est un document élaboré par consensus** au sein d'un organisme de normalisation par sollicitation des représentants de toutes les parties intéressées. Son adoption est précédée d'une enquête publique.

La norme fait l'objet d'un examen régulier pour évaluer sa pertinence dans le temps.

Toute norme est réputée en vigueur à partir de la date présente sur la première page.

## Pour comprendre les normes

L'attention du lecteur est attirée sur les points suivants :

Seules les formes verbales **doit et doivent** sont utilisées pour exprimer une ou des exigences qui doivent être respectées pour se conformer au présent document. Ces exigences peuvent se trouver dans le corps de la norme ou en annexe qualifiée de «normative». Pour les méthodes d'essai, l'utilisation de l'infinitif correspond à une exigence.

Les expressions telles que, **il convient et il est recommandé** sont utilisées pour exprimer une possibilité préférée mais non exigée pour se conformer au présent document. Les formes verbales **peut et peuvent** sont utilisées pour exprimer une suggestion ou un conseil utiles mais non obligatoires, ou une autorisation.

En outre, le présent document peut fournir des renseignements supplémentaires destinés à faciliter la compréhension ou l'utilisation de certains éléments ou à en clarifier l'application, sans énoncer d'exigence à respecter. Ces éléments sont présentés sous forme de **notes ou d'annexes informatives**.

## Commission de normalisation

Une commission de normalisation réunit, dans un domaine d'activité donné, les expertises nécessaires à l'élaboration des normes françaises et des positions françaises sur les projets de norme européenne ou internationale. Elle peut également préparer des normes expérimentales et des fascicules de documentation.

La composition de la commission de normalisation qui a élaboré le présent document est donnée ci-après. Lorsqu'un expert représente un organisme différent de son organisme d'appartenance, cette information apparaît sous la forme : organisme d'appartenance (organisme représenté).



**Vous avez utilisé ce document, faites part de votre expérience à ceux qui l'ont élaboré.**

Scannez le QR Code pour accéder au questionnaire de ce document ou retrouvez-nous sur <http://norminfo.afnor.org/norme/108644>.

---

## Microbiologie des eaux

## AFNOR T90D

---

### Composition de la commission de normalisation

Président : M PIERLOT

Secrétariat : M GAUDRIER — AFNOR

MME	AMMANNATI	ASPOSAN LABO REG ANALYSES EAUX
MME	ANTOINE	VILLE DE REIMS
M	BENISMAIL	NESTLE WATERS MANAGEMENT & TECHNOLOGY
MLLE	BERNARD	LABORATOIRE DEPARTEMENTAL D'ANALYSES
M	BICHOT	BIO-RAD
MME	BINET	EDF R&D
M	BLANC	CTC
DR	BLAZER	IDEXX LABS
MME	BOILLETOT	SOLABIA
M	BOUTON	PALL GENEDISC TECHNOLOGIES
M	CABON	NESTLE WATERS MANAGEMENT & TECHNOLOGY
M	CAILLAUD	IQUARES / PHILIPPE CAILLAUD
M	CANNOT	CTC
M	CARLIER	VILLE DE PARIS – LABORATOIRE D'HYGIENE
M	CHABEAUD	EUROFINS LABO MICROBIOLOGIE OUEST
M	CHAPERON	CAPSIS
MME	CHAUMET	EHESP — ECOLE HAUTES ETUDES EN SANTE PUBLIQUE
MME	CHEVALIER	ASPOSAN LABO REG ANALYSES EAUX
M	CIRCAL	SGS MULTILAB
MME	COGNAULT	INSTITUT LOUISE BLANQUET (EUROFINS ANALYSES ENVIRONNEMENT FRANCE)
M	COLIN	IDAC – INST DEPT ANALYSE CONSEIL (ASLAE)
MME	COLOCCI	LABORATOIRE DEPARTAL D'ANALYSES ET DE CONSEIL (ASLAE)
MME	COURTOIS	SUEZ ENVIRONNEMENT
MME	COUTURIER	SGS MULTILAB
MME	DE BUCHY	FRANCOISE DE BUCHY
MME	DEBEAUPUIS	SUEZ ENVIRONNEMENT
MME	DEFER	SILLIKER SAS
MME	DELABRE	GIE DES LABORATOIRES
M	DELOM	CTC

MME	DESLOGES	DEPARTEMENT – LDA – LVD (ASLAE)
MME	DESSERLE	GIE DES LABORATOIRES
MME	DIEULEVEUX	DPT DU CALVADOS — LABO FRANK DUNCOMBE
MME	DIRUIT	SARL BIO-CLIN
MME	DUBROU	VILLE DE PARIS — LABORATOIRE D'HYGIENE
MME	DUJARDIN	EAU DE PARIS
MME	DUMOUTIER	SUEZ ENVIRONNEMENT
MME	ENKIRI	VILLE DE PARIS — LABORATOIRE D'HYGIENE
MME	FABRE	LDCO 21 — LABO DEPT COTE D OR
M	FACON	BIO-RAD
M	FEINBERG	INRA
M	FONTAN	LABO DEPT DE L'EAU — CONSEIL GENERAL (ASLAE)
MME	GALLIOT	EAU DE PARIS
MME	GARAU	LD2H — LABO DEPT HYDROLOGIE HYGIENE (ASLAE)
MME	GARDYN	AES CHEMUNEX
M	GARRELLY	GL BIOCONTROL
M	GASSILLOUD	ANSES
MLLE	GAUDET	SILLIKER
MME	GERARD	EHESP — ECOLE HAUTES ETUDES EN SANTE PUBLIQUE
M	GIRONNET	ADGENE LABORATOIRE
MME	GODARD	CHU BESANCON-HOPITAL JEAN MINJOZ
MME	GRATLOUP	SARL BIO-CLIN
MME	GRILLON	CAR — CENTRE D'ANALYSES ET DE RECHERCHES
M	GUARINI	AGLAE
MLLE	GUICHET	EUROFINS LABO MICROBIOLOGIE OUEST
MME	GUILLOTIN	DION GENERALE DE LA SANTE
MME	GUITON	BURKERT SAS
MME	HALLIER SOULIER	PALL GENEDISC TECHNOLOGIES
MME	HARDOUIN	AFNOR
M	HOCDE	IDHESA BRETAGNE OCEANE
MME	HOUSSIN	DPT DU CALVADOS — LABO FRANK DUNCOMBE
MME	JACQUES	EUROFINS ANALYSES ENVIRONNEMENT FRANCE
MME	JULLIEN	LABORATOIRE DE ROUEN SAS
MME	KENTZINGER	MILLIPORE SAS
M	LE BIHAN	OXOID SAS
M	LE GENT	IDHESA BRETAGNE OCEANE
MME	LEBRETON	LDA50 — LABO DEPT ANALYSES MANCHE (ASLAE)

MME	LEDUNOIS	DION GENERALE DE LA SANTE
M	LEGRIS	VILLE DE REIMS
M	LEPAREUR	LASAT — SYND MIXTE LABO ANALYSES SEVRES ATLANTIQUE
MME	LEPEUPLE	ANJOU RECHERCHE GIE — VEOLIA ENVIRONNEMENT
M	MALAS	DPT DU CALVADOS — LABO FRANK DUNCOMBE
M	MAMODALY	COFRAC
MME	MATHIAUD	BIPEA
MME	MAUX	EUROFINS IPL NORD
M	MOLINIER	AGLAE
M	MOULIN	EAU DE PARIS
MME	NAKACHE — DANGLOT	SAUR
M	PAIXAO	SOLABIA SAS (SOLABIA)
MME	PARIS	SAEME — SA EAUX MINERALES EVIAN
M	PAVAGEAU	DION GENERALE DE LA SANTE
MME	PAYS-INGLESE	CONSEIL GENERAL DE HAUTE LOIRE — LDA (ASLAE)
M	PIERLOT	AGLAE
M	PLESIAT	CHU BESANCON-HOPITAL JEAN MINJOZ
M	POINTILLART	LASAT — SYND MIXTE LABO ANALYSES SEVRES ATLANTIQUE
MME	POTY	ENDETEC-CAE
MME	PRODHOMME	LDA 22 — LABO ANALYSES COTES D'ARMOR (ASLAE)
MME	PUCHOIS	EUROFINS IPL NORD
MME	PY	ANSES
M	QUIGNON	IUT
MME	RACAUD	SAUR
MME	RANNOU	ASSO ADRIA — ADRIA DEVELOPPEMENT
M	ROCQUE	ADGENE LABORATOIRE
MME	RODRIGUES	ISHA — INST SCIENTIFIQUE HYGIENE ANALYSE
M	ROUSSELIN	IDEXX
M	SEILLER	BIPEA
MME	SELVE	LDA 19 — LABO DEPT ANALYSES CORREZE (ASLAE)
MME	SIBELET	LASAT — SYND MIXTE LABO ANALYSES SEVRES ATLANTIQUE
MME	SINTONI	SARTORIUS STEDIM FRANCE SAS
MME	TAMACHE	SGS MULTILAB
M	THEPAUT	AES CHEMUNEX
M	THOMAS	EUROFINS IPL NORD
MME	WELTE	EAU DE PARIS
MME	ZOUICHA	PALL GENEDISC TECHNOLOGIES

**Les experts désignés ci-dessous ont particulièrement participé à l'élaboration de ce document :**

MME	BAUME	CENTRE NATIONAL DE REFERENCE LEGIONELLES
M	CARLIER	LABORATOIRE D'HYGIENE DE LA VILLE DE PARIS
M	CHAPERON	CAPSIS
MME	GODARD	CHU BESANCON
MME	POTY	VEOLIA
M	PIERLOT	AGLAE
M	RICHARD	ALPA GROUPE
M	ROCQUE	ADGENE LABORATOIRE
M	ROUSSELIN	IDEXX



# Sommaire

	Page
<b>1</b>	<b>Domaine d'application.....9</b>
<b>2</b>	<b>Références normatives.....9</b>
<b>3</b>	<b>Termes et définitions.....9</b>
<b>3.1</b>	<b>Définitions générales.....9</b>
<b>3.2</b>	<b>Définitions répondant aux besoins du présent document..... 10</b>
<b>4</b>	<b>Principe..... 11</b>
<b>5</b>	<b>Échantillonnage..... 11</b>
<b>6</b>	<b>Appareillage et verrerie..... 12</b>
<b>7</b>	<b>Milieux de culture, diluant, sérums et souches..... 13</b>
<b>7.1</b>	<b>Prescriptions générales..... 13</b>
<b>7.2</b>	<b>Diluant..... 13</b>
<b>7.2.1</b>	<b>Eau purifiée..... 13</b>
<b>7.2.2</b>	<b>Solution pH 2,0 ± 0,2..... 13</b>
<b>7.2.3</b>	<b>Solution tamponnée stérile..... 13</b>
<b>7.3</b>	<b>Milieux de culture..... 14</b>
<b>7.3.1</b>	<b>Milieux GVPC..... 14</b>
<b>7.3.2</b>	<b>Milieu BCYE α sans L-cystéine..... 16</b>
<b>7.3.3</b>	<b>Milieu BCYE α sans antibiotique..... 16</b>
<b>7.4</b>	<b>Pool de sérums anti-<i>Legionella pneumophila</i>..... 16</b>
<b>7.5</b>	<b>Souches pour le contrôle qualité..... 16</b>
<b>7.5.1</b>	<b><i>Legionella pneumophila</i> séro groupe 1..... 16</b>
<b>7.5.2</b>	<b><i>Legionella pneumophila</i> séro groupe 2 à 15..... 16</b>
<b>7.5.3</b>	<b><i>Legionella anisa</i>..... 17</b>
<b>8</b>	<b>Contrôle de performance de la méthode..... 17</b>
<b>9</b>	<b>Mode opératoire..... 17</b>
<b>9.1</b>	<b>Ensemencement..... 17</b>
<b>9.1.1</b>	<b>Eaux propres..... 17</b>
<b>9.1.2</b>	<b>Eaux sales..... 17</b>
<b>9.2</b>	<b>Incubation..... 19</b>
<b>9.3</b>	<b>Dénombrement des <i>Legionella</i>..... 19</b>
<b>9.3.1</b>	<b>Repérage des colonies caractéristiques de <i>Legionella</i> spp..... 19</b>
<b>9.3.2</b>	<b>Évaluation du nombre de colonies caractéristiques pour confirmation..... 19</b>
<b>9.3.3</b>	<b>Confirmation et dénombrement des <i>Legionella</i>..... 20</b>
<b>9.4</b>	<b>Identification des <i>Legionella pneumophila</i>..... 20</b>
<b>10</b>	<b>Expression des résultats..... 21</b>
<b>10.1</b>	<b>Cas des eaux propres..... 22</b>
<b>10.1.1</b>	<b>Boîteensemencée en direct..... 22</b>
<b>10.1.2</b>	<b>Boîtes issues des filtrations..... 22</b>
<b>10.2</b>	<b>Cas des eaux sales..... 22</b>
<b>10.2.1</b>	<b>Boîtesensemencées en direct..... 23</b>
<b>10.2.2</b>	<b>Boîtes issues de la concentration..... 23</b>
<b>10.2.3</b>	<b>Absence de colonies sur l'ensemble des boîtes..... 23</b>
<b>11</b>	<b>Résultats provisoires..... 24</b>
<b>12</b>	<b>Rapport d'essai..... 24</b>
	<b>Annexe A (normative) Boîtes de milieu GVPC à ensemer en fonction du type d'eau..... 25</b>

## NF T 90-431

<b>Annexe B (normative) Tableaux récapitulatifs des calculs et commentaires pour l'expression des résultats en fonction des volumes analysés, des boîtes retenues pour le calcul final et du nombre de colonies confirmées.....</b>	<b>26</b>
<b>Annexe C (informative) Exemples de dénombrements de <i>Legionella</i> spp et <i>Legionella pneumophila</i>.....</b>	<b>30</b>
<b>Annexe D (normative) Contrôle de performance .....</b>	<b>38</b>
D.1 Témoin blanc d'analyse.....	38
D.2 Contrôle des milieux de culture de dénombrement et de confirmation .....	38
D.3 Contrôle des réactifs.....	39
D.4 Contrôle de performance analytique .....	39
D.5 Suivi des rendements.....	39
<b>Annexe E (informative) Exemple de méthodologie pour l'étude des rendements.....</b>	<b>40</b>
E.1 Essai de rendement pour une eau propre.....	40
E.2 Essai de rendement pour une eau sale.....	42
<b>Annexe F (normative) Protocole confirmation et identification par méthode PCR.....</b>	<b>44</b>
<b>Annexe G (normative) Évaluation du nombre de colonies caractéristiques à confirmer.....</b>	<b>46</b>
<b>Annexe H (informative) Arbre décisionnel pour le rendu de résultats pour les eaux propres (non exhaustif).....</b>	<b>48</b>
<b>Bibliographie .....</b>	<b>49</b>

**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. Cette méthode est plus particulièrement adaptée pour la recherche de *Legionella pneumophila*. Dans le cas de recherche à caractère épidémiologique, cette méthode peut être adaptée en utilisant davantage de milieux et de méthodes de concentration de l'échantillon (contacter le Centre National de Référence des Légionelles).

## 1 Domaine d'application

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

Cette méthode faisant appel à un milieu sélectif peut être appliquée à tous les types d'eaux :

Eaux « propres » : eaux destinées à la consommation humaine, eaux chaudes sanitaires, eaux minérales naturelles à usage thermal, eaux de piscine et assimilées (spa,...).

Eaux « sales » : eaux de surface, eaux industrielles, eaux d'installation de refroidissement par dispersion d'eau dans un flux d'air (IRDEFA), eaux naturelles.

Cependant certaines eaux « propres » doivent être considérées et traitées comme des eaux « sales » en particulier si elles contiennent des dépôts amenant une coloration de la membrane ou si elles s'avèrent non ou difficilement filtrables : par exemple, dans le cas de certaines eaux prélevées en purge basse ou sur des points peu utilisés dans les réseaux d'eau chaude sanitaire.

## 2 Références normatives

Les documents ci-après, dans leur intégralité ou non, sont des références normatives indispensables à l'application 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).

NF EN ISO 8199, *Qualité de l'eau — Lignes directrices générales pour le dénombrement des micro-organismes sur milieu de culture (indice de classement : T 90-400)*

NF EN ISO 11133, *Microbiologie des aliments, des aliments pour animaux et de l'eau — Préparation, production, stockage et essais de performance des milieux de culture (indice de classement : V 08-104)*

NF EN ISO 19458, *Qualité de l'eau — Échantillonnage pour analyse microbiologique (indice de classement : T 90-480)*

## 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* spp**

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

## NF T 90-431

### 3.1.2

#### ***Legionella pneumophila***

*Legionella* répondant à la définition indiquée en 3.1.1 donnant une identification positive de l'espèce *L. pneumophila*, responsables de la plupart des cas de légionellose

## 3.2 Définitions répondant aux besoins du présent document

### 3.2.1

#### ***Legionella spp***

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

Note 1 à l'article : Les souches de *Legionella spp* sont souvent autofluorescentes, mais certaines souches de *Legionella spp* peuvent ne pas l'être

### 3.2.2

#### ***Legionella pneumophila***

microorganismes répondant à la définition indiquée en 3.2.1, non autofluorescents, et donnant une identification positive de l'espèce *L. pneumophila*

### 3.2.3

#### **eaux propres**

eaux destinées à la consommation humaine, eaux chaudes sanitaires, eaux minérales naturelles à usage thermal, eaux de piscine et assimilées (spa,...), eaux souterraines

### 3.2.4

#### **eaux sales**

eaux de surface, eaux industrielles, eaux d'installation de refroidissement par dispersion d'eau dans un flux d'air (IRDEFA), eaux naturelles

### 3.2.5

#### **boîte envahie flore**

boîte de culture ne pouvant être exploitée à cause de la présence de micro-organisme(s) empêchant l'isolement des colonies pour confirmation.

### 3.2.6

#### **flore interférente**

commentaire associé au rendu du résultat dans le cas où les « boîtes envahies flore » impactent le résultat (par exemple : rendu impossible de résultats, changement de seuil de détection, limitation de la quantification)

### 3.2.7

#### **boîte exploitable**

boîte de culture, non envahie flore, présentant un nombre de colonies compris entre 1 et 100 lorsque la culture s'effectue sur membrane, ou présentant un nombre de colonies entre 1 et 150 lorsque la culture s'effectue directement sur la gélose

### 3.2.8

#### **paire de boîtes**

pour les eaux sales, la paire de boîtes est constituée de la boîte ensemencée en direct et avec dilution. Pour les eaux propres, la paire de boîtes correspond aux boîtes de filtration 10 et 100 ml

## 4 Principe

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

- ensemencement direct de l'échantillon sur milieu sélectif ;
- concentration :
  - pour les eaux propres sur membranes en nitrate de cellulose ou en esters de cellulose ayant servies à la filtration de l'échantillon et ayant subies une décontamination par traitement acide ;
  - pour les eaux sales, préparation d'un concentrât soit par filtration sur membrane en polycarbonate avec remise en suspension par vortex soit par centrifugation avec reprise du culot dans un faible volume ; ensemencement du concentrât avant et après décontamination, sur milieu sélectif ;
- incubation pendant 8 j à 11 j à  $(36 \pm 2)$  °C ;
- repiquage de colonies typiques pour la recherche de bactéries exigeantes en L-cystéine et la mise en évidence des *Legionella* spp ;
- identification des colonies de *Legionella* spp pour la recherche des *Legionella pneumophila*.

## 5 Échantillonnage

Les échantillons (volume d'au moins 0,5 l) doivent être prélevés dans des récipients stériles avec toutes les précautions nécessaires (voir FD T 90-522 [1]). La modalité du prélèvement doit figurer dans le rapport d'essai si elle est connue. Pour le contrôle d'exposition (1<sup>er</sup> jet), prélever 1 l.

Les échantillons prélevés doivent être remis au maximum le lendemain du prélèvement au laboratoire chargé des analyses. Les ensemencements doivent être réalisés le plus rapidement possible et au maximum le lendemain du prélèvement. Le transport et la conservation de l'échantillon sont réalisés à température ambiante, de préférence en enceinte isotherme non réfrigérée. En cas de réception tardive d'échantillon liée à un évènement imprévisible, les analyses peuvent être réalisées le surlendemain du prélèvement.

Dans le cas d'échantillons provenant d'eaux chlorées, bromées ou ozonées, le récipient collecteur stérile doit de plus contenir du thiosulfate de sodium en quantité suffisante pour neutraliser les oxydants.

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.

D'autres produits biocides (bactéricides ou bactériostatiques) sont parfois utilisés, en particulier dans les installations de refroidissement par dispersion d'eau dans un flux d'air, il n'est toutefois pas toujours possible de neutraliser ces produits. 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.

## NF T 90-431

### 6 Appareillage et verrerie

Consommables (liste non exhaustive) et matériels courants 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  $(175 \pm 10)$  °C pendant au moins 1 h ;
- soit à l'autoclave, en la maintenant à une température de  $(121 \pm 3)$  °C pendant au moins 15 min.

#### 6.2 Loupe binoculaire avec grossissement X 20 à X 50. Une source de lumière latérale sera utilisée.

#### 6.3 Étuve ou enceinte thermostatée, réglée à $(36 \pm 2)$ °C, assurant une bonne répartition thermique et une humidité suffisante.

#### 6.4 Boîtes de Petri.

#### 6.5 Appareils de filtration montés soit sur rampe spéciale, soit sur fioles à vide.

#### 6.6 Membranes filtrantes en polycarbonate de diamètre moyen de pores 0,4 µm, d'environ 47 mm de diamètre.

#### 6.7 Membranes filtrantes foncées en nitrate ou ester de cellulose de diamètre moyen de pores 0,45 µm, d'environ 47 mm de diamètre.

#### 6.8 Pinces permettant de saisir les membranes sans les altérer.

#### 6.9 pH-mètre.

#### 6.10 Appareils de filtration à usage unique de diamètre moyen de pores 0,2 µm soit complets, soit à monter sur seringue, pour fabrication de milieu de culture.

#### 6.11 Microscope équipé pour la fluorescence.

Lampe à vapeur de Hg.

Filtres d'excitation 430 nm et 490 nm.

Filtre d'arrêt à 515 nm.

Miroirs diviseurs dichroïques : filtres de coupure 510 nm. Grossissement au moins x 400.

#### 6.12 Agitateur de type « Vortex » ou équivalent.

#### 6.13 Centrifugeuse permettant une accélération d'au moins 30 000 m.s<sup>-2</sup> 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 environ 366 nm) ou équivalent.

#### 6.15 Bain Marie thermostaté à $(50 \pm 1)$ °C.

## 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 (7.2.1).

### 7.2 Diluant

#### 7.2.1 Eau purifiée

L'eau utilisée doit être de l'eau distillée sur verre ou déminéralisée, exempte de substances susceptibles d'inhiber la croissance de micro-organismes dans les conditions de l'essai. Elle doit être conforme aux spécifications de l'ISO 3696:1987, qualité 3.

#### 7.2.2 Solution pH $2,0 \pm 0,2$

HCl 0,2 mol/L ..... 1 ml

KCl 0,2 mol/L ..... 18 ml

Cette solution peut être conservée pendant 3 mois à l'obscurité si elle est stérilisée par filtration sur filtre 0,2  $\mu\text{m}$  ou par autoclavage à  $(121 \pm 3)^\circ\text{C}$ . Vérifier le pH et la stérilité. La solution peut être conservée plus longtemps à la condition de vérifier le pH.

#### 7.2.3 Solution tamponnée stérile

Le diluant indiqué dans ce paragraphe est d'usage courant en microbiologie de l'eau. Toutefois, il est possible d'utiliser d'autres diluants adaptés.

Après la préparation, répartir chaque solution dans les bouteilles et stériliser, par exemple, en autoclave à  $(121 \pm 3)^\circ\text{C}$  durant 15 min. Il est aussi possible de répartir le diluant en observant la meilleure asepsie après sa stérilisation. Conserver à température ambiante ou au réfrigérateur à  $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$  durant 6 mois au plus. Si le diluant prend un aspect anormal, le mettre au rebut.

### Solution saline

#### Composition

Chlorure de sodium (NaCl) 8,5 g

Eau (7.2.1) 1 000 ml

#### Préparation

Dissoudre les composants dans l'eau, en chauffant si nécessaire. Ajuster le pH en ajoutant une solution d'hydroxyde de sodium [ $c(\text{NaOH}) = 1 \text{ mol/l}$ ] ou une solution d'acide chlorhydrique [ $c(\text{HCl}) = 1 \text{ mol/l}$ ] de sorte qu'après stérilisation (6.1) le pH soit de  $7,0 \pm 0,5$  à  $25^\circ\text{C}$ .

## NF T 90-431

### 7.3 Milieux de culture

#### 7.3.1 Milieux GVPC

##### 7.3.1.1 Milieu de base pour BCYE $\alpha$ (Buffered Charcoal Yeast Extract $\alpha$ -ketoglutarate).

Composition :

Extrait de levure ..... 10 g à 12 g

Charbon actif pulvérulent ..... 1,5 g à 2 g

Tampon ACES (2- [(2-Amino-oxoéthyl)-amino]  
éthanesulfonique) ..... 5 g à 10 g

$\alpha$ -cétoglutarate (sel de potassium) ..... 1 g

KOH 1 mol/L ..... 40 ml

Agar ..... 12 g à 17 g

Eau purifiée (7.2.1) ..... 950 ml

Préparation :

Mélanger l'extrait de levure, le charbon actif et l'agar. Dissoudre ces produits dans 450 ml d'eau purifiée additionnée de 40 ml de KOH. Dissoudre le tampon ACES dans 500 ml d'eau distillée. Mélanger les deux portions de 500 ml et ajouter l' $\alpha$ -cétoglutarate. Ajuster si nécessaire le pH à  $6,9 \pm 0,2$  avec KOH, 1 mol/L ou HCl, 1 mol/L.

Stériliser à l'autoclave à  $(121 \pm 3) ^\circ\text{C}$  pendant 15 min.

##### 7.3.1.2 Solution de L-cystéine

Composition :

L-cystéine, HCl ..... 0,40 g

Eau purifiée (7.2.1) ..... 5 ml

Préparation :  
Dissoudre la L-cystéine dans de l'eau purifiée et stériliser sur filtre à  $0,2 \mu\text{m}$  (6.10).

Cette solution se conserve pendant 3 mois à  $(-20 \pm 5) ^\circ\text{C}$ .

##### 7.3.1.3 Solution de pyrophosphate ferrique

Composition :

Pyrophosphate ferrique ..... 0,25 g

Eau purifiée (7.2.1) ..... 5 ml

Préparation :

Dissoudre le pyrophosphate ferrique dans l'eau purifiée et stériliser sur filtre à  $0,2 \mu\text{m}$  (6.10).



Cette solution se conserve pendant 3 mois à  $(-20 \pm 5) ^\circ\text{C}$ .

#### 7.3.1.4 Solution d'antibiotiques et glycine

Composition :

Polymyxine B (sulfate) .....	80 000 UI à 100 000 UI
Vancomycine hydrochloride .....	1 mg
Cycloheximide .....	80 mg
Glycine (sans ammonium) .....	3 g
Eau purifiée (7.2.1) .....	10 ml

Préparation

Dissoudre les antibiotiques dans l'eau purifiée et stériliser sur filtre à  $0,2 \mu\text{m}$  (6.10).

Il est aussi possible de préparer des solutions séparées d'antibiotiques et de glycine.

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

Préparation :

Au milieu de base (7.3.1.1) maintenu en surfusion à environ  $50 ^\circ\text{C}$ , ajouter les autres composants dans l'ordre ci-dessus, en opérant de façon stérile. Transvaser le milieu complet dans des boîtes de Petri stériles (6.4). L'épaisseur du milieu doit être de 5 mm environ. Laisser se solidifier. Vérifier que le pH est à  $6,9 \pm 0,2$ . Le milieu peut être conservé jusqu'au moment de l'emploi à  $(5 \pm 3) ^\circ\text{C}$  à l'obscurité pendant une période maximale de un mois.

NOTE Pour les milieux prêts à l'emploi, se conformer aux prescriptions du fournisseur.

## NF T 90-431

### 7.3.2 Milieu BCYE $\alpha$ sans L-cystéine

Composition :

Milieu de base (7.3.1.1) ..... 990 ml

Solution de pyrophosphate ferrique (7.3.1.3)..... 5 ml

Préparation :

Au milieu de base (7.3.1.1) maintenu en surfusion à environ 50 °C, ajouter la solution de pyrophosphate ferrique (7.3.1.3) en opérant de façon stérile. Transvaser le milieu complet dans des boîtes de Petri stériles (6.4). L'épaisseur du milieu doit être de 5 mm environ. Laisser se solidifier. Le milieu peut être conservé jusqu'au moment de l'emploi à (5  $\pm$  3) °C à l'obscurité pendant une période maximale de un mois.

NOTE Pour les milieux prêts à l'emploi, se conformer aux prescriptions du fournisseur.

### 7.3.3 Milieu BCYE $\alpha$ 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

Préparation :

Au milieu de base (7.3.1.1) maintenu en surfusion à environ 50 °C, ajouter les autres composants dans l'ordre ci-dessus, en opérant de façon stérile. Transvaser le milieu complet dans des boîtes de Petri stériles (6.4). L'épaisseur du milieu doit être de 5 mm environ. Laisser se solidifier. Le milieu peut être conservé jusqu'au moment de l'emploi à (5  $\pm$  3) °C à l'obscurité pendant une période maximale de un mois.

NOTE Pour les milieux prêts à l'emploi, se conformer aux prescriptions du fournisseur.

## 7.4 Pool de sérums anti-*Legionella pneumophila*

Dans les échantillons d'eaux, la possibilité d'interactions avec d'autres micro-organismes est fréquente. Utiliser un sérum polyclonal capable de réagir avec les sérogroupes connus de *Legionella pneumophila*. Un anticorps monoclonal capable de réagir avec un séro groupe précis de *Legionella pneumophila* peut également être utilisé afin d'affiner l'identification.

Des kits commerciaux d'identification de *Legionella pneumophila* au moyen d'anticorps peuvent être utilisés.

## 7.5 Souches pour le contrôle qualité

### 7.5.1 *Legionella pneumophila* séro groupe 1

EXEMPLE WDCM 00107 ou autre souche de *Legionella pneumophila* de séro groupe 1 référencée.

### 7.5.2 *Legionella pneumophila* séro groupe 2 à 15

EXEMPLE WDCM 00180 (séro groupe 4) ou autre souche de *Legionella pneumophila* de séro groupe différent référencée.

### 7.5.3 *Legionella anisa*

EXEMPLE WDCM 00106 ou autre souche de *Legionella anisa* référencée.

NOTE Se reporter au site <http://refs.wdcm.org/species.htm> pour trouver les références équivalentes des souches WDCM citées dans d'autres collections.

## 8 Contrôle de performance de la méthode

Le contrôle de performance de la méthode est décrit en Annexe D.

## 9 Mode opératoire

### 9.1 Ensemencement

Tous les ensemencements doivent être réalisés systématiquement et le même jour.

Le tableau donné en Annexe A présente une synthèse de ce paragraphe en précisant le nombre et le type de boîtes à ensemer en fonction du type d'eau à analyser.

#### 9.1.1 Eaux propres

Certaines eaux « propres » doivent être considérées et traitées comme des eaux « sales » (9.1.2) en particulier si elles contiennent des dépôts amenant une coloration de la membrane pouvant empêcher le repérage de colonies suspectes de *Legionella* spp, ou si le volume filtrable est inférieur à 100 ml.

##### 9.1.1.1 Ensemencement direct

Ensemencer par étalement 0,2 ml d'eau à analyser sur milieu GVPC (7.3.1.5).

##### 9.1.1.2 Concentration par filtration

Filtrer 10 ml d'eau sur une membrane de nitrate ou d'esters de cellulose (6.7) puis stopper l'aspiration. Ajouter un volume suffisant de solution pH 2 (7.2.2) pour couvrir la membrane pendant  $(5,0 \pm 0,5)$  min. La pression résiduelle ne doit pas empêcher l'action de la solution pH 2, le cas échéant elle devra être éliminée par exemple en soulevant la membrane. Rincer avec au moins 10 ml d'eau purifiée stérile (7.2.1) ou une solution tamponnée stérile (7.2.3). Déposer la membrane à l'endroit avec soin sur milieu GVPC (7.3.1), en veillant tout particulièrement à ne pas piéger de bulles d'air entre la membrane et le milieu.

Opérer de la même manière en filtrant 100 ml d'eau.

#### 9.1.2 Eaux sales

##### 9.1.2.1 Ensemencement direct

Ensemencer par étalement 0,2 ml d'eau à analyser sur milieu GVPC (7.3.1.5).

Ensemencer par étalement 0,2 ml de la dilution au 1/10 en eau purifiée (7.2.1) stérile sur le milieu GVPC (7.3.1.5).

## NF T 90-431

### 9.1.2.2 Concentration par filtration

Filtrer 500 ml d'eau sur une ou deux membrane(s) en polycarbonate (6.6) puis :

- Immerger la ou les membrane(s) en polycarbonate dans 1 récipient stérile contenant 5 mL d'eau à analyser ou d'eau purifiée (7.2.1). Agiter au moyen d'un vortex pendant un temps défini et à une vitesse définie lors du contrôle de performance (voir Annexe D). Le récipient à utiliser doit être de taille suffisante pour accueillir la ou les membranes et ne doit pas être de diamètre trop important pour permettre l'obtention d'un cône d'agitation (exemple récipient à fond conique, pilulier...). Si besoin, la (ou les) membranes peuvent être pliées afin d'être immergées. La mise en place du calcul de rendement doit permettre de s'assurer de la bonne remise en suspension lors de cette étape.

NOTE Ce temps d'agitation doit permettre l'obtention d'un cône d'agitation dans l'ensemble du récipient.

Ceci constitue le concentrât qui seraensemencé par étalement, sans et après traitement selon le protocole décrit dans le paragraphe 9.1.2.4.

### 9.1.2.3 Concentration par centrifugation

- Après homogénéisation, centrifuger à température ambiante 500 ml de l'échantillon dans 1 ou 2 récipients stériles à fond conique à environ  $30\,000\text{ m.s}^{-2}$  pendant 30 min ou autre valeur à valider conformément au contrôle de performance (Annexe D) ;
- éliminer le(s) surnageant(s) stérilement par aspiration en veillant à ne pas perturber le(s) culot(s) et en laissant un peu moins de 5 ml du surnageant (si deux récipients ont été utilisés, laisser moins de 5 ml de surnageant au total) ;
- remettre le(s) culot(s) en suspension (et les regrouper si deux récipients ont été utilisés) ;
- ramener le volume à 5 ml avec de l'eau à analyser ou de l'eau purifiée (7.2.1) stérile.

Ceci constitue le concentrât qui seraensemencé par étalement, sans et après traitement, selon le protocole décrit dans le paragraphe 9.1.2.4.

### 9.1.2.4 Ensemencement du concentrât

Ensemencer rapidement par étalement 0,1 ml du concentrât obtenu après filtration ou après centrifugation sur une boîte de milieu GVPC (7.3.1.5).

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

Traiter une troisième partie par traitement associé (thermique et acide) :

- traitement thermique :
  - porter 1 ml de concentrât dans un tube stérile et placer ce tube dans un bain thermostaté à  $(50 \pm 1)^\circ\text{C}$  pendant  $(30 \pm 1)$  min. Ensemencer rapidement une boîte de milieu sélectif (7.3.1.5) avec 0,1 ml de concentrât traité par la chaleur ;
- traitement acide :
  - ajouter un même volume de solution pH 2 (7.2.2) à un volume de concentrât (par exemple 0,5 ml ou 1 ml). Après un temps de contact de  $(5,0 \pm 0,5)$  min, ensemencer rapidement par étalement 0,2 ml sur une boîte de milieu GVPC ou  $2 \times 0,1$  ml sur deux boîtes de GVPC (7.3.1.5) ;

— traitement associé (thermique et acide) :

- porter 1 volume du concentrât (0,5 mL ou 1 mL) dans un tube stérile et placer ce tube dans un bain thermostaté à  $(50 \pm 1)^\circ\text{C}$  pendant  $(30 \pm 1)$  min. Sortir le tube du bain thermostaté. Ajouter un même volume de solution acide (7.2.2) (0,5 mL ou 1 mL). Après un temps de contact de  $(5,0 \pm 0,5)$  min, ensemercer rapidement par étalement 0,2 ml sur une boîte de milieu GVPC ou 2\*0,1 ml sur deux boîtes de GVPC (7.3.1.5).

NOTE Le concentrât restant peut être stocké à  $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$  dans le cas d'investigations épidémiologiques. Il ne doit en aucun cas être réutilisé en vue d'une analyse quantitative.

## 9.2 Incubation

Retourner les boîtes ainsi préparées et les placer dans l'enceinte thermostatée (6.3) à  $(36 \pm 2)^\circ\text{C}$  durant 8 j à 11 j. Examiner les boîtes au moins à trois reprises entre le 3<sup>ème</sup> jour d'incubation et la fin de la période d'incubation. Il est recommandé d'effectuer la première lecture le 3<sup>ème</sup> ou le 4<sup>ème</sup> jour notamment pour les eaux sales du fait de la possibilité d'une croissance d'une flore interférente.

## 9.3 Dénombrement des *Legionella*

### 9.3.1 Repérage des colonies caractéristiques de *Legionella* spp

Sont considérées comme caractéristiques les colonies qui présentent, après incubation à  $(36 \pm 2)^\circ\text{C}$ , une coloration généralement grise ou blanche le plus souvent avec un aspect de verre fritté à la loupe binoculaire et un contour de couleur variable. Elles peuvent changer d'aspect en vieillissant. Certaines sont fluorescentes sous lampe de Wood (ou équivalent).

Sur membrane, les colonies sont plus bombées, plus petites mais présentent généralement les mêmes caractéristiques de coloration que sur gélose.

Pour les eaux propres, à chaque examen des boîtes, considérer comme étant de types différents, les colonies apparaissant sur la boîte ensemencée en direct et les colonies apparaissant sur les boîtes avec membrane.

NOTE Il est généralement observé que les souches de *Legionella* spp ont une vitesse de croissance plus faible que celle des *Legionella pneumophila*

### 9.3.2 Évaluation du nombre de colonies caractéristiques pour confirmation

- Distinguer les différents types de colonies caractéristiques présentes sur les boîtes (un type rassemble des colonies d'aspect morphologique similaire). La loupe binoculaire peut être utilisée en cas de doute. La lampe de Wood (ou équivalent) 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 confirmations la boîte ou la paire de boîtes (3.2.8) présentant le nombre total de colonies caractéristiques ( $n = n_a + n_b + \dots + n_x + \dots$ ) susceptible de fournir le résultat final le plus élevé conformément au chapitre 10. Dans le cas de paires de boîtes (3.2.8) toutes deux exploitables, confirmer des colonies des deux boîtes ;

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

- si  $1 \leq n \leq 5$ , confirmer toutes les colonies de cette boîte ou la paire de boîtes (3.2.8) ;
- si  $n > 5$ , confirmer un total de 5 colonies minimum de cette boîte ou de la paire de boîtes (3.2.8), en veillant à confirmer au moins 2 colonies de chaque type lorsque  $n_x > 1$  ;

## NF T 90-431

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

NOTE Les colonies ne se développant pas à la même vitesse sur le milieu GVPC directement et sur les membranes, il est judicieux de réaliser des confirmations à partir de colonies de minimum 3 jours d'incubation pour les ensemencements sur GVPC, et à partir de colonies de minimum 4 jours d'incubation pour les boîtes avec membrane. De plus, afin de bien discerner les différents types de colonies, il peut être nécessaire d'attendre au moins cinq jours d'incubation avant de réaliser les confirmations.

Une représentation schématique ainsi que des exemples sont disponibles en Annexe G.

### 9.3.3 Confirmation et dénombrement des *Legionella*

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

- gélose BCYE  $\alpha$  sans L-cystéine (7.3.2) ;
- gélose BCYE  $\alpha$  avec L-cystéine (7.3.3).

Incuber à  $(36 \pm 2)$  °C et lire à partir de 2 jours.

La présence de culture sur gélose BCYE  $\alpha$  sans L-cystéine (7.3.2) infirme la présence de *Legionella*.

Sont considérées comme *Legionella* spp toutes les colonies présentant un aspect caractéristique et ne cultivant que sur milieu BCYE  $\alpha$  avec L-cystéine (7.3.3).

Des exemples de dénombrement de *Legionella* spp sont donnés en Annexe C.

La confirmation de colonies présumptives de *Legionella* spp et *Legionella pneumophila* peut être réalisée par qPCR :

- soit en accord avec la norme NF T 90-471 [2], la méthode sera mise en œuvre par des laboratoires en capacité d'attester de la maîtrise de cette norme conformément aux attentes de la NF EN ISO 17025 [4] et de l'Annexe F de la présente norme ;
- soit en utilisant des kits de qPCR certifiés pour leur conformité à la norme NF T 90-471 [2] par un organisme de certification, le laboratoire devra être en mesure d'attester de la compétence nécessaire et de la maîtrise de cette technique pour la mise en œuvre des techniques de PCR temps réel conformément aux attentes de la NF EN ISO 17025 [4] et de l'Annexe F du présent document.

NOTE D'autres méthodes de confirmation peuvent être également utilisées :

- a) Des méthodes validées selon la norme XP T 90-500 [3] traitant de la validation de méthodes de confirmation et d'identification et mises en œuvre par des laboratoires en capacité d'attester de la maîtrise de ces méthodes conformément aux attentes de la NF EN ISO 17025 [4].
- b) Des méthodes certifiées selon la norme XP T 90-500 [3] par un organisme de certification. Le laboratoire devra être en mesure d'attester de la compétence nécessaire et de la maîtrise de ces techniques conformément aux attentes de la NF EN ISO 17025 [4].

### 9.4 Identification des *Legionella pneumophila*

Tester en vue de la confirmation de l'espèce *Legionella pneumophila* toutes les colonies repiquées confirmées comme *Legionella* (9.3.3) non fluorescentes sous lampe de Wood (ou équivalent).

Utiliser pour les tests, les cultures obtenues après repiquage sur milieu BCYE $\alpha$  avec L-cystéine.

Sont considérées comme *L. pneumophila* les colonies précédentes qui donnent une réaction positive :

- en immunofluorescence ;
- ou en agglutination au latex en présence d'anticorps anti-*L. pneumophila*.

À chaque série analytique, des contrôles positifs et négatifs seront réalisés selon les préconisations du fabricant. En l'absence de recommandation par le fabricant, utiliser les souches de légionelles du paragraphe 7.5 du présent document.

NOTE Les *Legionella* présumées ne réagissant pas avec les anticorps anti-*Legionella pneumophila*, peuvent être envoyées pour identification plus complète à un laboratoire spécialisé.

L'identification de colonies présomptives de *Legionella* spp et *Legionella pneumophila* peut être réalisée par qPCR :

- soit en accord avec la norme NF T90-471 [2], la méthode sera mise en œuvre par des laboratoires en capacité d'attester de la maîtrise de cette norme conformément aux attentes de la NF EN ISO 17025 [4] et de l'Annexe F du présent document ;
- soit en utilisant des kits de qPCR certifiés pour leur conformité à la norme NF T 90-471 [2] par un organisme de certification, le laboratoire devra être en mesure d'attester de la compétence nécessaire et de la maîtrise de cette technique pour la mise en œuvre des techniques de PCR temps réel conformément aux attentes de la NF EN ISO 17025 [4] et de l'Annexe F du présent document.

NOTE D'autres méthodes d'identification peuvent être également utilisées :

- a) Des méthodes validées selon la norme XP T 90-500 [3] traitant de la validation de méthodes de confirmation et d'identification et mises en œuvre par des laboratoires en capacité d'attester de la maîtrise de ces méthodes conformément aux attentes de la NF EN ISO 17025 [4].
- b) Des méthodes certifiées selon la norme XP T 90-500 [3] par un organisme de certification. Le laboratoire devra être en mesure d'attester de la compétence nécessaire et de la maîtrise de ces techniques conformément aux attentes de la NF EN ISO 17025 [4].

Des exemples de dénombrement de *Legionella pneumophila* sont donnés en Annexe C.

## 10 Expression des résultats

Par convention, chaque colonie est considérée comme ayant été engendrée par un microorganisme. Pour le calcul du résultat, considérer la boîte conduisant au résultat le plus élevé.

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

- *Legionella* spp ..... UFC/litre ;
- dont *Legionella pneumophila* ..... UFC/litre ;

en gardant deux chiffres significatifs.

Les tableaux donnés en Annexes B et C synthétisent l'ensemble des cas évoqués dans ce paragraphe, et présentent certains cas particuliers (flore interférente...) pouvant être rencontrés.

Une schématisation des calculs pour les eaux propres est disponible en Annexe H.

## NF T 90-431

### 10.1 Cas des eaux propres

Considérer la (ou les) boîte(s) aboutissant au résultat le plus élevé parmi les cas suivants : boîteensemencée en direct (10.1.1) ou boîtes issues des filtrations (10.1.2)

#### 10.1.1 Boîteensemencée en direct

Dans le cas où la boîteensemencée en direct fournit un nombre exploitable ( $1 \leq n \leq 150$ ) de *Legionella* spp et/ou de *Legionella pneumophila* confirmées, exprimer le résultat de *Legionella* spp et de *Legionella pneumophila* de la façon suivante :

$$N = n \times 1\,000/0,2$$

Soit  $N = n \times 5\,000$  UFC/L

#### 10.1.2 Boîtes issues des filtrations

##### 10.1.2.1 Une seule boîte issue des filtrations est exploitable

Dans le cas où une seule boîteensemencée après filtration fournit un nombre exploitable ( $1 \leq n' \leq 100$ , ou  $1 \leq n'' \leq 100$ ) de *Legionella* spp et/ou de *Legionella pneumophila* confirmées, exprimer le résultat de *Legionella* spp et de *Legionella pneumophila* de la façon suivante :

— Pour un volume filtré de 10mL :  $N = n' \times 1\,000/10$  UFC/L, soit  $N = n' \times 100$  UFC/L

— Pour un volume filtré de 100mL :  $N = n'' \times 1\,000/100$  UFC/L, soit  $N = n'' \times 10$  UFC/L

Dans le cas où la boîteensemencée après filtration de 10 mL fournit un nombre entre 1 et 10 colonies et que la boîteensemencée après filtration de 100 mL fournit un nombre non exploitable ( $n'' > 100$ ), rendre le résultat comme étant supérieur à la limite haute de quantification de la boîteensemencée après filtration de 100 mL non exploitable de la façon suivante :  $N > 1\,000$  UFC/L.

##### 10.1.2.2 Les deux boîtes issues des filtrations sont exploitables

Dans le cas où les 2 boîtesensemencées après filtration fournissent un nombre exploitable ( $1 \leq n' \leq 100$ , et  $1 \leq n'' \leq 100$ ) de *Legionella* spp et/ou de *Legionella pneumophila* confirmées, exprimer le résultat de *Legionella* spp et de *Legionella pneumophila* de la façon suivante :

$$N = (n' + n'') \times 1\,000/110 \text{ UFC/L}$$

##### 10.1.2.3 Absence de colonies sur l'ensemble des boîtes

En l'absence de colonies sur les boîtesensemencées en direct et après filtration, exprimer le résultat de *Legionella* spp et de *Legionella pneumophila* de la façon suivante :

— *Legionella* spp ..... < 10 UFC/litre ;

— dont *Legionella pneumophila* ..... < 10 UFC/litre.

Commentaire : *Legionella* non détectées.

### 10.2 Cas des eaux sales

Considérer la (ou les) boîte(s) aboutissant au résultat le plus élevé parmi les cas suivants : boîtesensemencées en direct (10.2.1) ou boîtes issues de la concentration (10.2.2).



## 10.2.1 Boîtesensemencées en direct

### 10.2.1.1 Seule la boîteensemencée en direct sans dilution est exploitable

Dans le cas où seule la boîteensemencée en direct sans dilution est exploitable ( $1 \leq n \leq 150$ ) :

$$N = n \times 1\,000/0,2$$

Soit  $N = n \times 5\,000$  UFC/L

### 10.2.1.2 Seule la boîteensemencée en direct après dilution au 1/10<sup>e</sup> est exploitable

Dans le cas où seule la boîteensemencée en direct après dilution au 1/10<sup>e</sup> est exploitable ( $1 \leq n' \leq 150$ ), calculer le résultat de la façon suivante :

$$N = n' \times 1\,000 / (0,2/10)$$

Soit  $N = n' \times 50\,000$  UFC/L

### 10.2.1.3 Les deux boîtes en direct sont exploitables

Dans le cas où les deux boîtes sont exploitables ( $1 \leq n \leq 150$  et  $1 \leq n' \leq 150$ ), calculer le résultat de la façon suivante :

$$N = (n + n') \times 1\,000 / (0,2 + (0,2/10))$$

Soit  $N = (n + n') \times 4\,545$  UFC/L

## 10.2.2 Boîtes issues de la concentration

Parmi les boîtesensemencées après concentration (Tableau A.1) susceptibles de donner un nombre de colonies exploitables ( $1 \leq n'' \leq 150$ ), choisir d'une part celle qui conduit au résultat le plus élevé en *Legionella* spp, d'autre part celle qui conduit au résultat le plus élevé en *Legionella pneumophila* :

Dans le cas où la boîteensemencée après concentration, avec ou sans traitement, est exploitable ( $1 \leq n'' \leq 150$ ), calculer le résultat de la façon suivante :

$$N = n'' \times 5/0,1 \times \frac{1\,000}{500}$$

Soit  $N = n'' \times 100$  UFC/L

La présence d'une flore interférente peut gêner voire empêcher la détection et la quantification des *Legionella* spp et/ou *L. pneumophila* et ce malgré les différents traitements appliqués sur le concentrât. Selon les cas, les résultats et commentaires sont détaillés dans les Annexes B et C.

### 10.2.3 Absence de colonies sur l'ensemble des boîtes

En l'absence de colonies sur les boîtesensemencées en direct et après concentration, exprimer le résultat de *Legionella* et de *Legionella pneumophila* de la façon suivante :

— *Legionella* spp ..... < 100 UFC/litre ;

— dont *Legionella pneumophila* ..... < 100 UFC/litre.

## NF T 90-431

Commentaire : *Legionella* non détectées

Des cas particuliers (flore interférente,...) sont présentés en Annexes B et C.

### 11 Résultats provisoires

Des résultats provisoires avec référence au présent document peuvent être établis dans les conditions suivantes :

- les colonies ont pu être repiquées pour confirmation dès la première lecture à n jours ;
- les dénombrements des *Legionella* spp et *Legionella pneumophila* ont été effectués selon les paragraphes 9.3 et 9.4 ;
- les résultats sont exprimés selon l'Article 10.

Mentionner impérativement dans le rapport d'essai « Résultats provisoires issus de colonies confirmées. Seuls les résultats définitifs font foi ».

### 12 Rapport d'essai

Le rapport d'essai doit contenir les indications suivantes :

- toutes les informations nécessaires à l'identification de l'échantillon ;
- les résultats et commentaires exprimés sous la forme indiquée à l'Article 10 ;
- tout détail opératoire non prévu dans le présent document ainsi que les incidents susceptibles d'avoir agi sur les résultats ;
- la référence au présent document.
- les commentaires éventuels liés aux résultats d'analyses ;
- les dates de réception et de mise en analyse ;

Lorsqu'elles sont connues, le rapport mentionne toutes les informations relatives au prélèvement et aux traitements éventuels (désinfection, anti-corrosion, ...) appliqués sur l'eau analysée

## Annexe A (normative)

### Boîtes de milieu GVPC à ensemencher en fonction du type d'eau

**Tableau A.1**

	Eaux propres :	Eaux sales :
	Eaux chaudes sanitaires, eaux destinées à la consommation humaine, eaux thermales, eaux souterraines, eaux de piscine	Eaux industrielles, eaux de surface, eaux naturelles et eaux d'IRDEFA <sup>a</sup>
<b>Ensemencement direct :</b>		
0,2 ml pur	Oui	Oui
0,2 ml dilution 1/10		Oui
<b>Ensemencement du concentrat :</b>		
0,1 ml pur	—	Oui
Traitement thermique 0,1 ml	—	Oui
Traitement acide (0,2 ml ou 2 × 0,1 ml)		Oui
Traitement associé (0,2 ml ou 2 × 0,1 ml)	—	Oui
<b>Filtration sur membrane et dépôt de la membrane sur le milieu après traitement acide</b>		
Volume filtré de 100 ml	Oui	—
Volume filtré de 10 ml	Oui	
<sup>a</sup> Concerne également le cas particulier des eaux chaudes sanitaires, eaux destinées à la consommation humaine, eaux thermales, eaux souterraines présentant des dépôts ou amenant une coloration de la membrane pouvant empêcher le repérage de colonies suspectes de <i>Legionella</i> ou si le volume filtrable est inférieur à 100 ml.		

## Annexe B (normative)

### Tableaux récapitulatifs des calculs et commentaires pour l'expression des résultats en fonction des volumes analysés, des boîtes retenues pour le calcul final et du nombre de colonies confirmées

Tableau B.1 (1 sur 2)

Eaux sales ou non filtrables : [B]

Direct	Direct 1/10	Concentrat	Concentrat traité thermique	Concentrat traité acide ou associé	Résultat UFC/L	Commentaire
Envahie flore <sup>a</sup>	Envahie flore <sup>a</sup>	Envahie flore <sup>a</sup>	Envahie flore <sup>a</sup>	Envahie flore <sup>a</sup>	Ininterprétable	Présence d'une flore interférente empêchant la détection des <i>Legionella</i> .
Envahie flore <sup>a</sup>	$n' = 0$	Envahie flore <sup>a</sup>	Envahie flore <sup>a</sup>	Envahie flore <sup>a</sup>	$< 50\,000$	Présence d'une flore interférente portant le seuil de détection des <i>Legionella</i> à 50 000 UFC/L. <i>Legionella</i> non détectées.
$n = 0$	$n' = 0$	Envahie flore <sup>a</sup>	Envahie flore <sup>a</sup>	Envahie flore <sup>a</sup>	$< 5\,000$	Présence d'une flore interférente portant le seuil de détection des <i>Legionella</i> à 5 000 UFC/L. <i>Legionella</i> non détectées.
$n = 0$	Envahie flore <sup>a</sup>	Envahie flore <sup>a</sup>	Envahie flore <sup>a</sup>	Envahie flore <sup>a</sup>	$< 5\,000$	Présence d'une flore interférente portant le seuil de détection des <i>Legionella</i> à 5 000 UFC/L. <i>Legionella</i> non détectées.
$n = 0$	$n' = 0$	Envahie flore <sup>a</sup>	$n'' = 0$	$n'' = 0$	$< 100$	<i>Legionella</i> non détectées.
$n = 0$	$n' = 0$	Envahie flore <sup>a</sup>	Envahie flore <sup>a</sup>	$n'' = 0$	$< 100$	<i>Legionella</i> non détectées.
$n = 0$	$n' = 0$	Envahie flore <sup>a</sup>	$n'' = 0$	Envahie flore <sup>a</sup>	$< 100$	<i>Legionella</i> non détectées.
$0 < n \leq 150$	$0 < n' \leq 150$	Envahie flore <sup>a</sup>	Envahie flore <sup>a</sup>	Envahie flore <sup>a</sup>	$(n + n') * 4\,545$	
$0 < n \leq 150$	$n' = 0$	Envahie flore <sup>a</sup>	Envahie flore <sup>a</sup>	Envahie flore <sup>a</sup>	$n * 5\,000$	
Envahie flore <sup>a</sup>	$0 < n' \leq 150$	Envahie flore <sup>a</sup>	Envahie flore <sup>a</sup>	Envahie flore <sup>a</sup>	$n' * 50\,000$	
$n = 0$	$n' = 0$	$0 < n'' \leq 150$	$n'' = 0$	$n'' = 0$	$n'' * 100$	
$n = 0$	$n' = 0$	$0 < n'' \leq 150$	Envahie flore <sup>a</sup>	$n'' = 0$	$n'' * 100$	

Tableau B.1 (2 sur 2)

Eaux sales ou non filtrables : [B]

Direct	Direct 1/10	Concentrat	Concentrat traité thermique	Concentrat traité acide ou associé	Résultat UFC/L	Commentaire
$n>150$	$0< n' <150$	-	-	-	$n' * 50\ 000$ ou $>750\ 000$	
$n>150$	$n'>150$	-	-	-	$>7\ 500\ 000$	
$0< n <150$	$n' = 0$	$0 < n'' <150$ ou Envahie flore <sup>a</sup>			$n * 5\ 000$ ou $n'' * 100$	
$n = 0$ ou Envahie flore <sup>a</sup>	$n' = 0$ ou Envahie flore <sup>a</sup>	Au moins une boîte avec $n'' > 150$			$> 15\ 000$	<i>Legionella</i> détectées, flore interférente limitant la quantification des Legionella.
$0< n <150$	$0<n'<150$	$0 < n'' <150$ ou Envahie flore <sup>a</sup>			$(n+n') * 4\ 545$ ou $n'' * 100$	
<sup>a</sup> En cas de présence de boîte envahie flore, si un résultat provisoire confirmé donne une concentration en <i>Legionella</i> et/ou en <i>Legionella pneumophila</i> supérieure à celle observée à la lecture finale, il convient de rendre le résultat intermédiaire accompagné du commentaire suivant : «Résultat issu d'une lecture intermédiaire. Présence de flore interférente pouvant amener à une sous-estimation du résultat».						
n = nombre de colonies confirmées en <i>Legionella</i> ou <i>Legionella pneumophila</i> sur les boites de gélose issues de l'ensemencement en direct. n' = nombre de colonies confirmées en <i>Legionella</i> ou <i>Legionella pneumophila</i> sur les boites de gélose issues de l'ensemencement en direct au 1/10. n'' = nombre de colonies confirmées en <i>Legionella</i> ou <i>Legionella pneumophila</i> , sur les boites de gélose issues du concentrat.						

Tableau B.2 (1 sur 2)

Eaux propres :

Direct	Filtration de 10 ml	Filtration de 100 ml	Résultat (UFC/L)	Commentaire
0	0	0	< 10	<i>Legionella</i> non détectées
0	0	$n'' \leq 100$	$n'' * 10$	
0	$n' \leq 100$	0	$n' * 100$	
0	$n' \leq 100$	$n'' \leq 100$	$(n' + n'') * 1\,000 / 110$	
$n \leq 150$	$n' \leq 100$	$n'' \leq 100$	$n * 5\,000$ <b>ou</b> $(n' + n'') * 1\,000 / 110$ Rendre le résultat le plus élevé en <i>Legionella</i> et <i>Legionella pneumophila</i>	
0	0	$n'' > 100$	> 1 000	
0	$n' \leq 10$	$n'' > 100$	> 1 000	
0, 1, 2	$n' > 100$	$n'' > 100$	> 10 000	
$n > 150$	Quel que soit le résultat		> 750 000	
Envahie flore <sup>a</sup>	$n' \leq 100$	$n'' \leq 100$	$(n' + n'') * 1\,000 / 110$	
$n \leq 150$	Envahie flore <sup>a</sup>	$n'' \leq 100$	$n * 5\,000$	
$n \leq 150$	$n' \leq 100$	Envahie flore <sup>a</sup>	$n * 5\,000$ <b>ou</b> $n' * 100$ Rendre le résultat le plus élevé en <i>Legionella</i> et <i>Legionella pneumophila</i>	
Envahie flore <sup>a</sup>	Envahie flore <sup>a</sup>	$n'' \leq 100$	$n'' * 10$	
$n \leq 150$	Envahie flore <sup>a</sup>	Envahie flore <sup>a</sup>	$n * 5\,000$	
Envahie flore <sup>a</sup>	$n' \leq 100$	Envahie flore <sup>a</sup>	$n' * 100$	
Envahie flore <sup>a</sup>	Envahie flore <sup>a</sup>	Envahie flore <sup>a</sup>	Résultat ininterprétable	Présence d'une flore interférente empêchant la détection des <i>Legionella</i> .

Tableau B.2 (2 sur 2)

Eaux propres :

Direct	Filtration de 10 ml	Filtration de 100 ml	Résultat (UFC/L)	Commentaire
0	Envahie flore <sup>a</sup>	Envahie flore <sup>a</sup>	< 5000	Présence d'une flore interférente portant le seuil de détection des <i>Legionella</i> à 5 000 UFC/L. <i>Legionella</i> non détectées.
Envahie flore <sup>a</sup>	0	Envahie flore <sup>a</sup>	< 100	Présence d'une flore interférente portant le seuil de détection des <i>Legionella</i> à 100 UFC/L. <i>Legionella</i> non détectées.
0	0	Envahie flore <sup>a</sup>	< 100	Présence d'une flore interférente portant le seuil de détection des <i>Legionella</i> à 100 UFC/L. <i>Legionella</i> non détectées.
Envahie flore <sup>a</sup>	Envahie flore <sup>a</sup>	0	< 10	<i>Legionella</i> non détectées.
<p><math>n</math> = nombre de colonies confirmées en <i>Legionella</i> ou <i>Legionella pneumophila</i> sur les boîtes de gélose issues de l'ensemencement en direct.</p> <p><math>n'</math> = nombre de colonies confirmées en <i>Legionella</i> ou <i>Legionella pneumophila</i> sur les boîtes de gélose issues de la filtration 10 ml.</p> <p><math>n''</math> = nombre de colonies confirmées en <i>Legionella</i> ou <i>Legionella pneumophila</i>, sur les boîtes de gélose issues de la filtration 100 ml.</p>				
<p><sup>a</sup> En cas de présence de boîte envahie flore, si un résultat intermédiaire confirmé donne une concentration en <i>Legionella</i> et/ou en <i>Legionella pneumophila</i> supérieure à celle observée à la lecture finale, il convient de rendre le résultat intermédiaire accompagné du commentaire suivant : « Résultat issu d'une lecture intermédiaire. Présence de flore interférente pouvant amener à une sous-estimation du résultat ».</p>				

**NF T 90-431**

**Annexe C**  
(informative)

**Exemples de dénombrements de *Legionella* spp et *Legionella pneumophila***

**Cas des Eaux propres : Eaux chaudes sanitaires**

EXEMPLE 1

Boîtesensemencées	Ensemencement en direct	Concentration 10 ml	Concentration 100 ml
Nombre de colonies caractéristiques par boîte	1 type a	66 type b	> 100 type b
Nombre minimum de colonies caractéristiques à confirmer (confirmation <i>Legionella</i> spp)	1	5	0
Nombre de colonies confirmées en <i>Legionella</i> spp/boîte	1	<u>66</u>	0
Nombre de colonies à identifier (confirmation <i>L. pneumophila</i> )	1	5	0
Nombre de colonies confirmées en <i>L. pneumophila</i> /boîte	1	<u>66</u>	0
Résultat <i>Legionella</i> spp dont <i>L. pneumophila</i>	66 x 100 = 6 600 UFC/L 66 x 100 = 6 600 UFC/L		
Commentaire	—		

EXEMPLE 2

Boîtesensemencées	Ensemencement en direct	Concentration 10 ml	Concentration 100 ml
Nombre de colonies caractéristiques par boîte	3 type a	20 type b 10 type c	> 100 type b
Nombre minimum de colonies caractéristiques à confirmer (confirmation <i>Legionella</i> spp)	3	2 type b 2 type c	0
Nombre de colonies confirmées en <i>Legionella</i> spp/boîte	<u>3</u>	20 type b 10 type c	0
Nombre de colonies à identifier (confirmation <i>L. pneumophila</i> )	3	2 type b 2 type c	0
Nombre de colonies confirmées en <i>L. pneumophila</i> /boîte	0	<u>20</u> type b 0 type c	0



— 31 —

NF T 90-431

Résultat <i>Legionella</i> spp dont <i>L. pneumophila</i>	3 x 5 000 = 15 000 UFC/L 20 x 100 = 2 000 UFC/L
Commentaire	—

## NF T 90-431

### EXEMPLE 3

Boîtesensemencées	Ensemencement en direct	Concentration 10 ml	Concentration 100 ml
Nombre de colonies caractéristiques par boîte	Envahie flore	30 type a	90 type a
Nombre minimum de colonies caractéristiques à confirmer (confirmation <i>Legionella</i> spp)	0	5 type a	
Nombre de colonies confirmées en <i>Legionella</i> spp/boîte	0	<u>30</u> type a	<u>90</u> type a
Nombre de colonies à identifier (confirmation <i>L. pneumophila</i> )	0	5 type a	
Nombre de colonies confirmées en <i>L. pneumophila</i> /boîte	0	<u>30</u> type a	<u>90</u> type a
Résultat <i>Legionella</i> spp dont <i>L. pneumophila</i>	$((30 + 90) \times 1000) / 110 = 1\ 100\ \text{UFC/L}$ $((30 + 90) \times 1000) / 110 = 1\ 100\ \text{UFC/L}$		
Commentaire	—		

### EXEMPLE 4

Boîtesensemencées	Ensemencement en direct	Concentration 10 ml	Concentration 100 ml
Nombre de colonies caractéristiques par boîte	3 type a en lecture intermédiaire. Envahie flore en lecture finale	20 type b en lecture intermédiaire. 23 type b lecture finale	80 type b en lecture intermédiaire. 87 type b lecture finale
Nombre minimum de colonies caractéristiques à confirmer (confirmation <i>Legionella</i> spp)	3 type a	2 type b	
Nombre de colonies confirmées en <i>Legionella</i> spp boîte	<u>3</u> type a	23 type b	87 type b
Nombre de colonies à identifier (confirmation <i>L. pneumophila</i> )	3 type a	2 type b	
Nombre de colonies confirmées en <i>L. pneumophila</i> /boîte	<u>3</u> type a	23 type b	87 type b
Résultat <i>Legionella</i> spp dont <i>L. pneumophila</i>	$3 \times 5\ 000 = 15\ 000\ \text{UFC/L}$ $3 \times 5\ 000 = 15\ 000\ \text{UFC/L}$		
Commentaire	Résultat issu d'une lecture intermédiaire. Présence de flore interférente pouvant amener à une sous-estimation du résultat		

## EXEMPLE 5

Boîtesensemencées	Ensemencement en direct	Concentration 10 ml	Concentration 100 ml
Nombre de colonies caractéristiques par boîte	1 type b	55 type a	> 100 type a
Nombre minimum de colonies caractéristiques à confirmer (confirmation <i>Legionella</i> spp)	1 type b	5 type a	0
Nombre de colonies confirmées en <i>Legionella</i> spp/boîte	1 type b	<u>55</u> type a	0
Nombre de colonies à identifier (confirmation <i>L. pneumophila</i> )	0	5 type a	0
Nombre de colonies confirmées en <i>L. pneumophila</i> /boîte	0	<u>55</u> type a	0
Résultat <i>Legionella</i> spp dont <i>L. pneumophila</i>	55 x 100 = 5 500 UFC/L 55 x 100 = 5 500 UFC/L		
Commentaire	—		

NOTE Un commentaire non normatif du type : « Présence d'autres *Legionella* non prises en compte dans la quantification » peut être ajouté.

## EXEMPLE 5B

Boîtesensemencées	Ensemencement en direct	Concentration 10 ml	Concentration 100 ml
Nombre de colonies caractéristiques par boîte	1 type b	20 type a	> 100 type a
Nombre minimum de colonies caractéristiques à confirmer (confirmation <i>Legionella</i> spp)	1 type b	2 type a	0
Nombre de colonies confirmées en <i>Legionella</i> spp /boîte	<u>1</u> type b	20 type a	0
Nombre de colonies à identifier (confirmation <i>L. pneumophila</i> )	1 type b	2 type a	0
Nombre de colonies confirmées en <i>L. pneumophila</i> /boîte	<u>1</u> type b	0	0
Résultat <i>Legionella</i> spp dont <i>L. pneumophila</i>	1 x 5000 = 5 000 UFC/L 1 x 5000 = 5 000 UFC/L		
Commentaire	—		

## NF T 90-431

NOTE Un commentaire non normatif du type : « Présence d'autres *Legionella* non prises en compte dans la quantification » peut être ajouté.

### Cas des eaux sales et/ou non filtrables (Exemple : Eaux d'IRDEFA)

EXEMPLE 6 Volume traité de 500 ml.

	Ensemencements directs		Ensemencements après concentration			
Boîtes ensemencées	Non dilué	Dilué 1/10	Non traité pur	Traité par la chaleur	Traité par l'acide	Traité chaleur + acide
Nombre de colonies caractéristiques par boîte	96 type a 53 type b 6 type c	8 type a 4 type b 1 type d	Envahie flore	Envahie flore	Envahie flore	Envahie flore
Nombre minimum de colonies caractéristiques à confirmer (confirmation <i>Legionella</i> spp)	—	2 type a 2 type b 1 type d	—	—	—	—
Nombre de colonies confirmées en <i>Legionella</i> spp/boîte	—	8 type a 4 type b 1 type d	—	—	—	—
Nombre de colonies à identifier (confirmation <i>L. pneumophila</i> )	—	2 type a 2 type b 1 type d	—	—	—	—
Nombre de colonies confirmées en <i>L. pneumophila</i> /boîte	—	4 type b 1 type d	—	—	—	—
Résultat <i>Legionella</i> spp dont <i>L. pneumophila</i>	(8 + 4 + 1) × 50 000 = 650 000 UFC/L (4 + 1) × 50 000 = 250 000 UFC/L					
Commentaire	—					
Type a : colonies correspondant au même type caractéristique, différent des types b, c et d. Type b : colonies correspondant au même type caractéristique, différent des types a, c et d. Type c : colonies correspondant au même type caractéristique, différent des types a, b et d. Type d : colonies correspondant au même type caractéristique, différent des types a, b et c. NOTE La boîte ensemencée en direct non diluée ne peut être exploitée pour les calculs et les repiquages de souches car <i>n</i> >150.						

## EXEMPLE 6B Volume traité de 500 ml.

	Ensemencements directs		Ensemencements après concentration			
Boîtes ensemencées	Non dilué	Dilué 1/10	Non traité pur	Traité par la chaleur	Traité par l'acide	Traité chaleur + acide
Nombre de colonies caractéristiques par boîte	20 type a	2 type a 3 type b	Envahie flore	Envahie flore	Envahie flore	Envahie flore
Nombre minimum de colonies caractéristiques à confirmer (confirmation <i>Legionella</i> spp)	3 type a		—	—	—	—
		2 type b				
Nombre de colonies confirmées en <i>Legionella</i> spp /boîte	20 type a	2 type a	—	—	—	—
		3 type b				
Nombre de colonies à identifier (confirmation <i>L. pneumophila</i> )	3 type a		—	—	—	—
		2 type b				
Nombre de colonies confirmées en <i>L. pneumophila</i> /boîte	0 type a		—	—	—	—
		3 type b				
Résultat <i>Legionella</i> spp dont <i>L. pneumophila</i>	(2+3) x 50 000 = 250 000 UFC/L 3 x 50 000 = 150 000 UFC/L					
Commentaire	—					
Type a : colonies correspondant au même type caractéristique, différent du type b. Type b : colonies correspondant au même type caractéristique, différent du type a, NOTE Le calcul en <i>Legionella</i> spp obtenu à partir de la boîte <i>Direct non dilué</i> et <i>Direct dilué 1/10</i> donne un résultat inférieur à celui en <i>Legionella pneumophila</i> . Le résultat en <i>Legionella</i> spp est donc réalisé à partir de la boite <i>Direct dilué 1/10</i> .						

## EXEMPLE 7 Volume traité de 500 ml.

	Ensemencements directs		Ensemencements après concentration			
Boîtesensemencées	Non dilué	Dilué 1/10	Non traité pur	Traité par la chaleur	Traité par l'acide	Traité chaleur + acide
Nombre de colonies caractéristiques par boîte	10 type a	0	Envahie flore	Envahie flore	Envahie flore	3 type b
Nombre minimum de colonies caractéristiques à confirmer (confirmation <i>Legionella</i> spp)	5 type a	—	—	—	—	2 type b
Nombre de colonies confirmées en <i>Legionella</i> spp/boîte	10 type a	—	—	—	—	3 type b
Nombre de colonies à identifier (confirmation <i>L. pneumophila</i> )	5 type a	—	—	—	—	2 type b
Nombre de colonies confirmées en <i>L. pneumophila</i> /boîte	0	—	—	—	—	3 type b
Résultat <i>Legionella</i> spp dont <i>L. pneumophila</i>	10 x 5 000 = 50 000 UFC/L 3 x 100 = 300 UFC/L					
Commentaire	—					

## NF T 90-431

EXEMPLE 8 Volume traité de 500 ml.

	Ensemencements directs		Ensemencements après concentration			
Boîtesensemencées	Non dilué	Dilué 1/10	Non traité pur	Traité par la chaleur	Traité par l'acide	Traité chaleur + acide
Nombre de colonies caractéristiques par boîte	10 type a	0	Envahie flore	Envahie flore	Envahie flore	3 type b
Nombre minimum de colonies caractéristiques à repiquer (confirmation <i>Legionella</i> spp)	5 type a	—	—	—	—	2 type b
Nombre de colonies confirmées en <i>Legionella</i> spp/boîte	<u>10</u> type a	—	—	—	—	3 type b
Nombre de colonies à identifier (confirmation <i>L. pneumophila</i> )	5 type a	—	—	—	—	2 type b
Nombre de colonies confirmées en <i>L. pneumophila</i> /boîte	0	—	—	—	—	0
Résultat <i>Legionella</i> spp dont <i>L. pneumophila</i>	$10 \times 5\,000 = 50\,000 \text{ UFC/L}$ $< 100 \text{ UFC/L}$					
Commentaire	<i>Legionella pneumophila</i> non détectées.					

## EXEMPLE 9 Volume traité de 500 ml.

	Ensemencements directs		Ensemencements après concentration			
Boîtesensemencées	Non dilué	Dilué 1/10	Non traité pur	Traité par la chaleur	Traité par l'acide	Traité chaleur + acide
Nombre de colonies caractéristiques par boîte	9 type a en lecture intermédiaire. Flore interférente en	0	Envahie flore	Envahie flore	Envahie flore	25 type a
Nombre minimum de colonies caractéristiques à confirmer (confirmation <i>Legionella</i> spp)	5 type a	—	—	—	—	
Nombre de colonies confirmées en <i>Legionella</i> spp/boîte	2 type a	—	—	—	—	25 type a
Nombre de colonies à identifier (confirmation <i>L. pneumophila</i> )	5 type a	—	—	—	—	—
Nombre de colonies confirmées en <i>L. pneumophila</i> /boîte	2 type a	—	—	—	—	25 type a
Résultat <i>Legionella</i> spp dont <i>L. pneumophila</i>	$9 \times 5\,000 = 45\,000$ UFC/L $9 \times 5\,000 = 45\,000$ UFC/L					
Commentaire	Résultat issu d'une lecture intermédiaire. Présence de flore interférente pouvant amener à une sous-estimation du résultat					

## EXEMPLE 10 Volume traité de 500 ml.

	Ensemencements directs		Ensemencements après concentration			
Boîtesensemencées	Non dilué	Dilué 1/10	Non traité pur	Traité par la chaleur	Traité par l'acide	Traité chaleur + acide
Nombre de colonies caractéristiques par boîte	3 type a	0	Envahie flore	Envahie flore	Envahie flore	Envahie flore
Nombre minimum de colonies caractéristiques à repiquer (confirmation <i>Legionella</i> spp)	3 type a	—	—	—	—	—
Nombre de colonies confirmées en <i>Legionella</i> spp/boîte	3 type a	—	—	—	—	—
Nombre de colonies à identifier (confirmation <i>L. pneumophila</i> )	3 type a	—	—	—	—	—
Nombre de colonies confirmées en <i>L. pneumophila</i> /boîte	0 type a	—	—	—	—	—
Résultat <i>Legionella</i> spp dont <i>L. pneumophila</i>	$3 \times 5\,000 = 15\,000$ UFC/L $< 5\,000$ UFC/L					
Commentaire	Présence d'une flore interférente portant le seuil de détection des <i>Legionella pneumophila</i> à 5 000 UFC/L. <i>Legionella pneumophila</i> non détectées.					

**NF T 90-431****Annexe D**  
(normative)**Contrôle de performance**

Les contrôles permettent de garantir la justesse relative et la fidélité des mesures réalisées par le laboratoire. Les fréquences des contrôles indiquées sont les fréquences minimales à appliquer lors de la mise en routine de ces techniques.

**D.1 Témoin blanc d'analyse**

Pour chaque série d'analyses (ensemble de mesures successives réalisées sur une même chaîne analytique, et des conditions suffisamment stables pour que l'on puisse considérer comme des conditions de répétabilité) il est impératif de réaliser au minimum un essai à blanc. L'essai à blanc devra utiliser l'ensemble des consommables nécessaires à la réalisation d'une analyse et permettra d'attester de la stérilité de l'ensemble des consommables.

**D.2 Contrôle des milieux de culture de dénombrement et de confirmation**

Milieu prêt à l'emploi disposant d'un certificat de conformité fournisseur faisant référence à la norme NF EN ISO 11133 ou le présent document : à contrôler selon une fréquence définie et justifiée par le laboratoire en fonction de son volume d'activité.

Milieu de culture préparés par le laboratoire : à contrôler à chaque lot.

**Tableau D.1**

Milieu	Type	Micro-organismes	Fonction	Incubation	Souches de contrôle	Numéro WDCW	Milieu de référence	Méthode de contrôle	Critères	Réactions caractéristiques
GVPC	S	<i>Legionella</i>	Productivité	2 à 5 jours	<i>Legionella pneumophila</i>	00107 ou 00180	BCYE	Quantitative	$P_R \geq 0,5$	Colonies blanches-grises-bleues-violettes avec un bord entier et présentant un aspect en verre dépoli caractéristique
				5 à 10 jours	<i>Legionella anisa</i>	00106				
			Spécificité	3 jours	<i>Enterococcus faecalis</i>	00009 ou 00087	—	Qualitative	Inhibition totale (0)	—



— 39 —  
**Tableau D.2**

NF T 90-431

Milieu	Témoin	Souche	Référence WDCM	Caractère observé
BCYE $\alpha$ (base sans L-cystéine)	Positif	<i>Escherichia coli</i>	00012 ou 00013	Culture
	Négatif	<i>Legionella pneumophila</i>	00107 ou 00180	Pas de culture
BCYE $\alpha$ (base avec L-cystéine)	Positif	<i>Legionella pneumophila</i>	00107 ou 00180	Culture

### D.3 Contrôle des réactifs

Réaliser les contrôles suivants à chaque changement de lots de réactif :

Immunofluorescence : Réaliser le contrôle positif à partir d'une souche de *Legionella pneumophila* (7.5.1 ou 7.5.2) et le contrôle négatif à partir d'une souche de *Legionella anisa* (7.5.3).

Agglutination : Réaliser le contrôle positif à partir d'une souche de *Legionella pneumophila* séroroupe 1 (7.5.1) et d'une souche de *Legionella pneumophila* séroroupe 2-15 (7.5.2). Réaliser le contrôle négatif à partir d'une souche de *Legionella anisa* (7.5.3).

### D.4 Contrôle de performance analytique

Le but de ce contrôle est de surveiller et de maintenir la performance de son processus analytique (contrôle de la méthode, des membranes, des milieux...). Ce contrôle ne peut être utilisé pour comparer les laboratoires entre eux. Afin de mettre en place une carte de contrôle il est nécessaire de réaliser une étude sur le rendement. Ces rendements sont à effectuer pour les types d'eau analysée au laboratoire à minima avec une souche de *Legionella pneumophila*. Une souche isolée de l'environnement peut être utilisée. Les mesures des rendements sont à effectuer en duplicat.

### D.5 Suivi des rendements

La fréquence des contrôles de rendement est à adapter en fonction du volume d'analyse réalisé par le laboratoire. Pour les laboratoires effectuant moins de 40 analyses par mois, il faut effectuer au moins un rendement R par trimestre. Pour les laboratoires effectuant au moins 40 analyses par mois, il faut effectuer au moins un rendement R mensuel (exemple Annexe E).

Une carte de contrôle doit être réalisée pour suivre les valeurs de rendement. Les bornes de la carte de contrôle sont définies comme étant les valeurs encadrant la valeur de rendement de référence (Rf). Cette valeur de rendement de référence est obtenue à partir des résultats des 10 premiers essais.

Le rendement R doit être compris entre 66 % et 150 % de Rf.

## NF T 90-431

### Annexe E (informative)

#### Exemple de méthodologie pour l'étude des rendements

##### E.1 Essai de rendement pour une eau propre

###### EXEMPLE 1

###### — Préparation d'une culture bactérienne :

Repiquer sur une gélose GVPC une colonie de *Legionella pneumophila* de 5 à 7 jours de croissance (7.5), issue d'une première gélose GVPC.

###### — Préparation des suspensions bactériennes :

Après 72 heures de croissance sur GVPC, prélever des colonies pour préparer une suspension mère M dans une solution tamponnée stérile (7.2.3) à environ 0,5 de DO à 600 nm. Ceci correspond environ à  $10^9$  UFC/mL.

Préparer une suspension S1 en ajoutant 0,5 ml de la suspension mère M à 500 mL d'une solution tamponnée stérile (7.2.3) ;

Préparer une deuxième solution S2 en ajoutant 0,5 ml de la suspension S1 à 500 mL d'une solution tamponnée stérile (7.2.3) ;

Préparer une troisième suspension (S3) en ajoutant 1 ml de la suspension S2 à 500 mL de solution tamponnée stérile (7.2.3).

###### — Réalisation de l'essai de rendement (à faire en duplicat) :

Étaler sur gélose GVPC 0,2 ml de la suspension S2, (dénumbrer les colonies soit : P1 et P2)

Filtrer et traiter 100 ml de la suspension S3 comme indiqué dans le paragraphe 9.1.1.2 (dénumbrer les colonies soit F1 et F2)

###### — Calcul du rendement (en %) :

$$R = [(F1 + F2)/2] / [(P1+P2)/2] \times 100$$

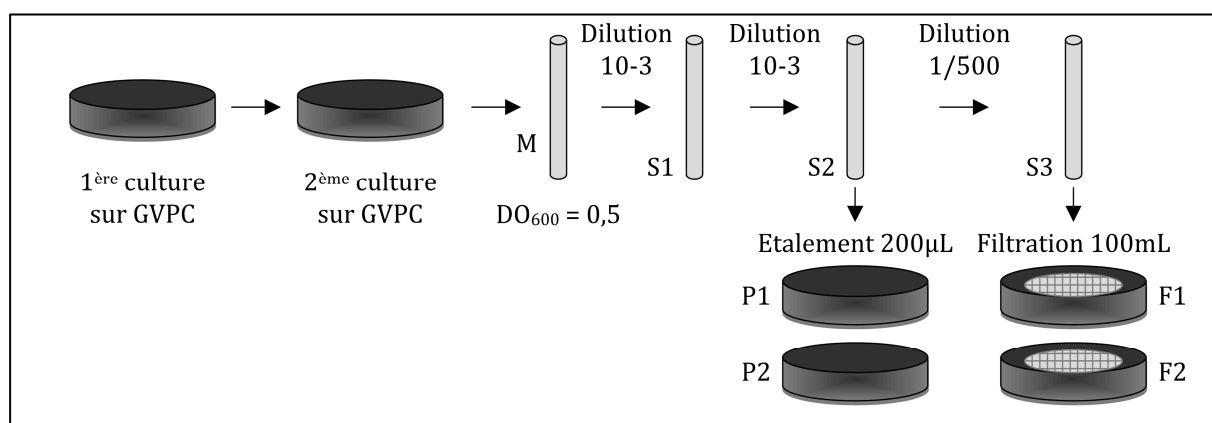


Figure E.1

## EXEMPLE 2

### — Préparation d'une culture bactérienne :

Ensemencer une gélose GVPC avec une souche de *Legionella pneumophila*.

### — Préparation des suspensions bactériennes :

Après 72 heures d'incubation, prélever des colonies pour préparer une suspension mère M dans une solution de tryptone sel entre 0,4 et 0,45 de DO à 650 nm.

Réaliser une suspension D1, en effectuant une dilution à  $10^{-6}$  dans de l'eau distillée par dilutions successives

Ajouter 200  $\mu$ L de D1 dans 20 ml d'eau distillée afin d'obtenir la suspension D2

### — Réalisation de l'essai de rendement (à raison de 5 réplicats) :

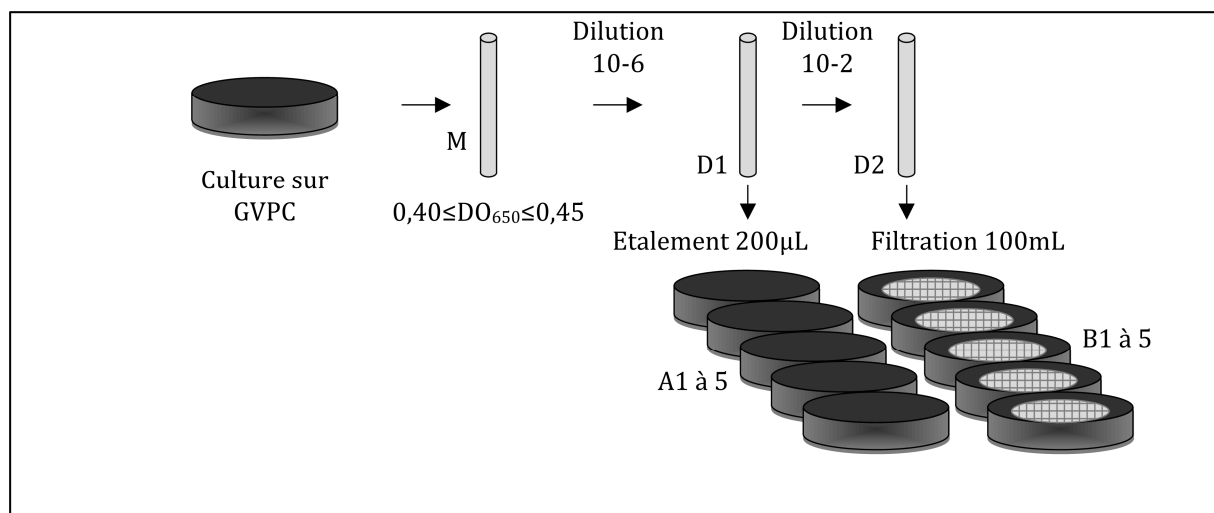
Étaler 200  $\mu$ L de D1 sur une gélose GVPC (dénombrer les colonies A1, A2, A3, A4, A5)

Filtrer et traiter l'intégralité de la suspension D2 comme indiqué dans le paragraphe 9.1.1.2 (dénombrer les colonies B1, B2, B3, B4, B5)

Lire les boîtes le 4<sup>ème</sup> ou le 5<sup>ème</sup> jour et le 10<sup>ème</sup> jour

### — Calcul du rendement :

$$R = [(B1+B2+B3+B4+B5) / (A1+A2+A3+A4+A5)] \times 100 \%$$



**Figure E.2**

## EXEMPLE 3

### — Préparer une suspension M de 4 ml de *Legionella pneumophila* séroroupe 1 à partir de bactéries en incubation depuis 3 ou 4 jours (il est possible d'utiliser des souches calibrées).

### — La suspension doit correspondre à une concentration permettant d'obtenir entre 20 et 80 colonies par boîtes ensemencées en direct.

### — Ensemencer en duplicat par étalement 0,2 ml de la suspension M sur une boîte GVPC (le nombre moyen de colonies trouvées est noté B3).

### — Ajouter 2 ml de la suspension M à 198 ml d'eau stérile, pour obtenir la suspension S.

## NF T 90-431

- En duplicat, filtrer et traiter 100 ml de la suspension S comme indiqué dans le paragraphe 9.1.1.2 (le nombre moyen de colonies trouvées est noté B4)
- Calculer ensuite les rendements de récupération :

$$R = (B4*4) / (B3*20) \times 100$$

### EXEMPLE

B3 : nombre de colonie sur les boitesensemencées en direct : **60 / 62**

B4 : nombre de colonie sur les boitesensemencées après filtration de 100 ml : **68 / 76**

Rendement eaux propres :  $((68+76)/2)*4 / (((60+62)/2)*20) * 100 = 24 \%$

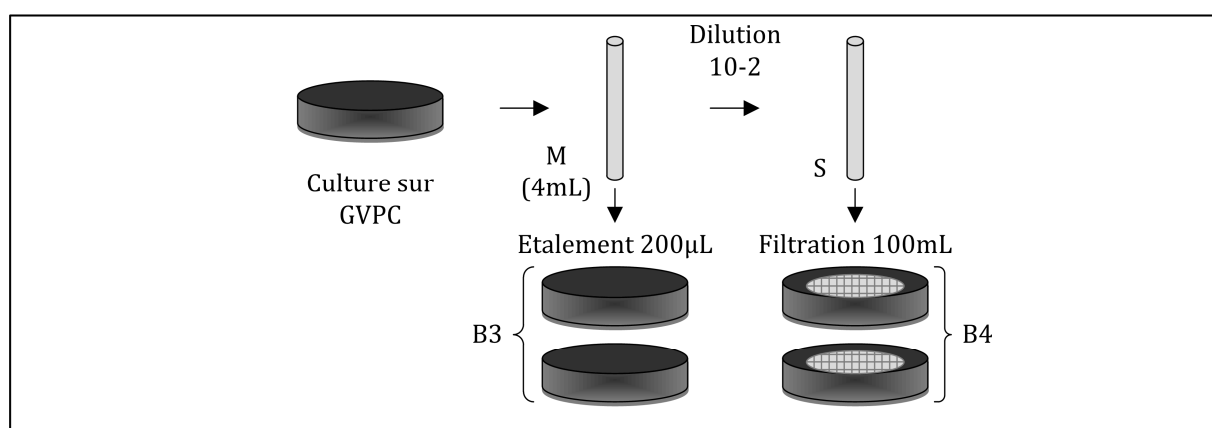


Figure E.3

## E.2 Essai de rendement pour une eau sale

### EXEMPLE

- Préparer une suspension M de 100 ml de *Legionella pneumophila* séro groupe 1 à partir de bactéries en incubation depuis 3 ou 4 jours (il est possible d'utiliser des souches calibrées).
- La suspension doit correspondre à une concentration permettant d'obtenir entre 20 et 80 colonies par boîtesensemencées en direct.
- Ensemencer en duplicat par étalement 0,2 ml de la suspension sur une boîte GVPC (le nombre moyen de colonies trouvées est noté B1).
- Ajouter 400 ml d'eau stérile à la suspension mère pour obtenir la suspension S.
- En duplicat, filtrer ou centrifuger 500 mL de la suspension S comme indiqué dans les paragraphes 9.1.2.2 et 9.1.2.3. Ensemencer en duplicat par étalement 0,1 ml de concentrât repris dans 5mL (le nombre moyen de colonies trouvées est noté B2) ;
- Calculer ensuite les rendements de récupération :

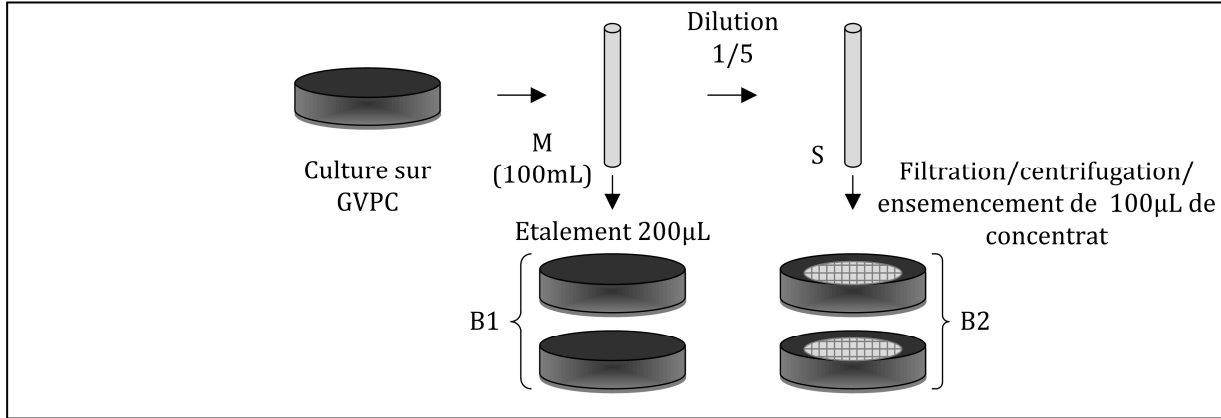
$$R = (B2*50) / (B1*500) \times 100$$

# EXEMPLE

B1 : nombre de colonies sur les boîtesensemencées en direct : 63/59

B2 : nombre de colonies sur les boîtesensemencées après filtration (ou centrifugation) de 500 ml et étalement du concentrat : 70/74

Rendement eaux sales :  $\frac{((70+74)/2) \times 50}{((63+59)/2) \times 500} \times 100 = 12 \%$



**Figure E.4**

## NF T 90-431

### Annexe F (normative)

#### Protocole confirmation et identification par méthode PCR

Ce protocole est rédigé pour l'utilisation de la PCR dans l'attente d'un document normatif concernant les méthodes de confirmation et d'identification alternative.

L'étude de spécificité du système PCR doit être validée tierce partie (certification) ou par l'accréditation de méthodes développées en interne selon la norme NF T 90-471 (paragraphe 10.2).

Cette annexe est à utiliser par les laboratoires utilisateurs de la norme NF T 90-471 [2].

#### **Dossier de validation**

Comme pour les autres méthodes de confirmation et d'identification, le laboratoire doit prouver la maîtrise de sa technique. Pour cela, le laboratoire doit effectuer à minima un dossier de validation définissant l'ensemble des points critiques et mettre en place des moyens de maîtrise. Les différents points critiques doivent être conformes à l'ensemble des chapitres de la norme ISO 17025 [4], comme entre autres :

- Paragraphe 4.6 : les consommables utilisés doivent être contrôlés et vérifiés avant utilisation comme étant conformes aux spécifications attendues.
- Paragraphe 5.2 : le laboratoire devra montrer la compétence de son personnel (pour cela, l'application du chapitre 6.3.2 peut suffire)
- Paragraphe 5.3 : suivant la méthode, le laboratoire devra mettre en place des postes de travail dédiés afin d'éviter toute contamination
- Paragraphe 5.4 : le laboratoire devra mettre en œuvre des témoins appropriés pour contrôler l'absence de contamination lors de la manipulation mais également des témoins lui permettant de conclure sans ambiguïté.
- Paragraphe 5.5 et 5.6 : le laboratoire devra mettre en place un programme permettant de garantir la bonne utilisation et le bon raccordement de ces appareils de mesure utilisés.

#### **Exemple de Protocole de préparation de l'échantillon**

- À partir d'une boîte de GVPC ou d'une boîte de BCYE, prélever une colonie isolée de *Legionella* à l'aide d'une ose ;
- re-suspendre la colonie dans 300 à 500 µl d'eau stérile *Legionella* free : suspension A ;
- homogénéiser la suspension A au vortex pendant 20 s ;
- séparer la suspension A en 2 x 100 µL : suspension B ;
- incuber la suspension B 10 min à 95 °C ;
- réaliser l'analyse en PCR à partir de l'extrait d'ADN (B) ;

### **Témoins positif et négatif de PCR (à minima)**

Pour chaque série analytique de confirmation/identification, réaliser un contrôle négatif et un contrôle positif de PCR à partir d'une souche de *Legionella pneumophila* (voir 3.2.2).

### **Interprétation des résultats**

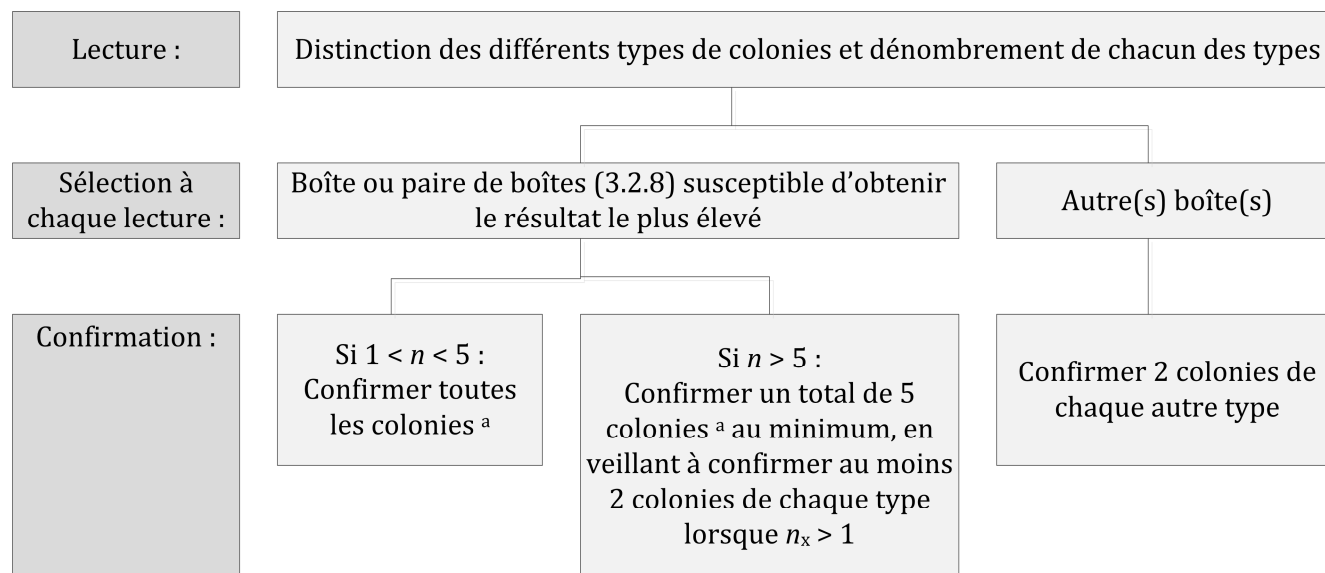
- Le résultat est négatif (colonie non confirmée ou non identifié) lorsque le Cq > valeur intercept ;
- Le résultat est positif (colonie confirmée ou identifiée) lorsque le Cq < 30 ;
- Si le Cq est compris entre la valeur de l'intercept et 30, l'analyse PCR doit être de nouveau réalisée.

NOTE L'extrait d'ADN B peut être conservé à - 20 °C pendant 3 mois pour permettre de réaliser un autre test PCR.

**NF T 90-431**

**Annexe G**  
(normative)

**Évaluation du nombre de colonies caractéristiques à confirmer**



<sup>a</sup> En cas de paires de boîtes, nombre de colonies à repiquer en tout sur ces boîtes (pas sur chacune des boîtes)

**Figure G.1 — Schéma pour l'évaluation du nombre de colonies caractéristiques à confirmer**

**EXEMPLES – Cas des eaux propres**

	Direct	10mL	100mL
Nombre de colonies et types de colonies	2a	1b	<1
Nombre de colonies à confirmer	2a	1b	0

	Direct	10mL	100mL
Nombre de colonies et types de colonies	6a 2b	6c 4d 2e	50c 30d 10e
Nombre de colonies à confirmer	3a 2b	2c 2d 2 <sup>e</sup> b)	

	Direct	10mL	100mL
Nombre de colonies et types de colonies	6a	20b	3c
Nombre de colonies à confirmer	5a	2b	2c

	Direct	10mL	100mL
Nombre de colonies et types de colonies	1a	1b 6c	5b 50c
Nombre de colonies à confirmer	1a	2b 2c <sup>b)</sup>	

<sup>b)</sup> En sélectionnant les colonies de chaque type les mieux isolées sur l'une des boîtes obtenues après concentration de l'échantillon



# EXEMPLES – Cas des eaux sales

	Direct		Concentrât			
	Non dilué	Dilué 1/10	Non traité pur	Traité par la chaleur	Traité par l'acide	Traité par chaleur + acide
Nombre de colonies et types de colonies	1a	<1	15a	12a	10a	12a
Nombre de colonies à confirmer	1a	0	0	0	0	0

	Direct		Concentrât			
	Non dilué	Dilué 1/10	Non traité pur	Traité par la chaleur	Traité par l'acide	Traité par chaleur + acide
Nombre de colonies et types de colonies	1a	<1	15a 6b	12a 4b	10a 4b	12a 8b
Nombre de colonies à confirmer	1a	0	2b b)			

	Direct		Concentrât			
	Non dilué	Dilué 1/10	Non traité pur	Traité par la chaleur	Traité par l'acide	Traité par chaleur + acide
Nombre de colonies et types de colonies	5a	3a	40a 6b	30a 4b	27a 3b	35a 5b
Nombre de colonies à confirmer	5a c)		2b b)			

b) En sélectionnant les colonies de chaque type les mieux isolées sur l'une des boîtes obtenues après concentration de l'échantillon

c) En sélectionnant les colonies les mieux isolées sur la boîte non diluée et la boîte diluée 1/10



## Bibliographie

- [1] FD T 90-522, *Qualité de l'eau — Guide technique de prélèvement pour la recherche de Legionella dans les eaux*
- [2] NF T 90-471, *Qualité de l'eau — Détection et quantification des Legionella et/ou Legionella pneumophila par concentration et amplification génique par réaction de polymérisation en chaîne en temps réel (qPCR)*
- [3] XP T 90-500, *Validation de Méthode de confirmation et d'identification (à paraître)*
- [4] NF EN ISO 17025, *Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais*