

---

## GELOSE SELECTIVE GVPC POUR *LEGIONELLA*

---

### DENOMBREMENT DE *LEGIONELLA* DANS LES EAUX

#### 1 DOMAINE D'UTILISATION

---

La gélose sélective GVPC pour *Legionella* est destinée au dénombrement, à l'isolement et à la culture des espèces de *Legionella* dans les eaux propres (eaux chaudes sanitaires, eaux de baignade...) et les eaux sales (eaux industrielles, eaux des tours aéroréfrigérantes...).

La formule-type répond à la composition définie dans les normes NF T90-431 et NF EN ISO 11731.

#### 2 HISTORIQUE

---

En 1977, MacDade *et al.* furent les premiers à isoler l'agent responsable de la maladie des Légionnaires, une bactérie désormais appelée *Legionella pneumophila*. Après cette découverte, de nombreuses *Legionella* ont été décelées dans des environnements aquatiques d'eau douce : circuits de distribution d'eau, systèmes de climatisation, tours de refroidissement, eaux thermales. On dénombre actuellement 43 espèces de *Legionella*.

En 1978, Weaver réussit à cultiver des *Legionella* sur une gélose Mueller-Hinton chocolat. Feeley *et al.* en déduisit que la cystéine et le pyrophosphate ferrique pouvaient remplacer les suppléments vitaminés et l'hémoglobine présents dans la gélose Mueller-Hinton chocolat. Leurs travaux aboutirent à la formulation d'un milieu appelé F-G Agar. Ils déterminèrent également qu'une atmosphère enrichie à 2,5% en CO<sub>2</sub> était nécessaire à la culture des *Legionella*.

En 1979, Feeley *et al.* modifièrent le milieu F-G en remplaçant l'hydrolysate de caséine par de l'extrait autolytique de levure, en ajoutant du charbon actif et en y supprimant l'amidon. Le milieu CYE obtenu permettait une meilleure croissance des *Legionella*.

En 1980, Pasculle *et al.* ont complété le milieu CYE avec un tampon ACES. Ils démontrèrent que ce milieu, dénommé BCYE, présentait une meilleure récupération des *Legionella* et pouvait être incubé en aérobiose.

En 1981, Edelstein a augmenté la sensibilité du milieu en ajoutant de l' $\alpha$ -cétoglutarate (milieu BCYE $\alpha$ ) et Wadowsky et Yee suggérèrent d'incorporer de la glycine, de la vancomycine et de la polymyxine B (milieu GVP) pour obtenir un milieu sélectif.

En 1984, Dennis *et al.* formulèrent le milieu GVPC en ajoutant du cycloheximide dans le milieu GVP. Ils montrèrent que le milieu sélectif finalement obtenu, permettait d'augmenter le taux d'isolement des *Legionella*.

#### 3 PRINCIPES

---

L'extrait autolytique de levure constitue le substrat nutritif permettant la croissance des *Legionella*.

Le charbon actif décompose le peroxyde d'hydrogène (production toxique du métabolisme), capture le dioxyde de carbone et modifie la tension superficielle.

Le maintien du pH est assuré par le tampon ACES/KOH. Sa présence permet d'incuber les milieux en aérobiose.

La cystéine et le pyrophosphate ferrique représentent des éléments nutritifs indispensables pour la culture des *Legionella*.

L' $\alpha$ -cétoglutarate est un activateur de la croissance des *Legionella*.

La microflore secondaire est inhibée par l'association entre la glycine, la vancomycine, la polymyxine B et le cycloheximide.

## 4 FORMULE-TYPE

La composition peut être ajustée de façon à obtenir des performances optimales.

Pour 1 litre de milieu :

- Extrait autolytique de levure.....	10,0 g
- Charbon actif.....	2,0 g
- $\alpha$ -cétoglutarate, sel monopotassique.....	1,0 g
- ACES (2-[2-amino-oxoéthyl]-amino] éthanesulfonique).....	10,0 g
- Hydroxyde de potassium.....	2,8 g
- L-cystéine, chlorhydrate.....	0,4 g
- Pyrophosphate ferrique.....	0,25 g
- Glycine.....	3,0 g
- Vancomycine.....	1,0 mg
- Polymyxine B.....	80000 UI
- Cycloheximide.....	80,0 mg
- Agar agar bactériologique.....	12,0 g

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25 °C : 6,7-7,0.

## 5 MODE D'EMPLOI

**Recherche et Dénombrement des Legionelles selon la norme NF EN ISO 11731 :**

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

- Filtrer sur membranes un volume déterminé de l'échantillon d'eau.

Echantillon non traité :

- Placer l'une des membranes directement sur une boîte de gélose BCYE (BM072).

Echantillon après traitement acide :

- Procéder au traitement à la solution acide d'une ou plusieurs membranes.
  - Transférer sur une ou plusieurs géloses sélectives telles que le milieu GVPC (BM071 ou BM227) ou BCYE+AB.

Echantillon concentré :

- Procéder au lavage d'une membrane afin d'obtenir un échantillon concentré.
- Répartir le concentré obtenu en 3 portions : non-traitée, traitée à la solution acide et traitée thermiquement.
- Ensemencer 0,1 à 0,5 mL de chaque portion sur gélose BCYE (BM072) et sur une ou plusieurs géloses sélectives telles que le milieu GVPC ou BCYE+AB.
- Incuber les boîtes à 36 ± 2 °C pendant 7 à 10 jours.

**Échantillons ayant une forte concentration en micro-organismes interférents**

Echantillon non concentré :

- Répartir l'échantillon en 3 portions : traitée à l'acide, traitée thermiquement et non traitée.
- Étaler 0,1 ml à 0,5 ml de chaque portion sur une boîte de gélose GVPC (BM071 ou BM227).

Echantillon concentré ou dilué :

- Diluer l'échantillon au 1/10<sup>e</sup> ou concentrer l'échantillon par filtration puis lavage de la membrane.
- Répartir l'échantillon en 3 portions : traitée à l'acide, traitée thermiquement et non traitée.
- Étaler 0,1 ml à 0,5 ml de chaque portion sur une boîte de gélose GVPC (BM071 ou BM227).
- Incuber les boîtes à 36 ± 2 °C pendant 7 à 10 jours.

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

Echantillon non concentré :

- Étaler 0,1 ml à 0,5 ml de l'échantillon sur une boîte de gélose GVPC (BM071 ou BM227).

Echantillon après traitement thermique et acide :

- Effectuer un traitement thermique puis à la solution acide de l'échantillon d'eau.
- Diluer l'échantillon traité au 1/10<sup>e</sup> et au 1/100<sup>e</sup>.
- Étaler 0,1 mL à 0,5 mL de chaque dilution sur une boîte de gélose GVPC (BM071 ou BM227).

✓ **Ensemencement :**  
Selon le protocole approprié

✓ **Incubation :**  
7 à 10 j à 36 ± 2 °C

- Incuber les boîtes à  $36 \pm 2$  °C pendant 7 à 10 jours.

**NOTE :**

Se référer à la norme NF EN ISO 11731 pour les procédures de lavage et de traitement des échantillons.

**Recherche et Dénombrement des Legionelles selon la norme NF T 90-431 :**

**Eaux propres**

Ensemencement direct

- Faire sécher les boîtes pré-coulées de gélose GVPC (BM071 ou BM227) à l'étuve, couvercle entrouvert.
- Ensemencer 0,2 mL de l'échantillon d'eau à l'aide d'un étaleur stérile.
- Incuber à  $36 \pm 2$  °C pendant 8 à 11 jours.

✓ **Ensemencement :**  
Direct : 0,2 mL  
Filtration : 10 et 100 mL  
(traitement acide)

✓ **Incubation :**  
8 à 11 jours à 36 °C

Concentration par filtration

- Filtrer 10 et 100 mL d'échantillon d'eau sur une membrane en nitrate ou esters de cellulose.
- Recouvrir la membrane avec une solution tampon pH 2.0 pendant 5 minutes.
- Rincer avec de l'eau distillée stérile.
- Déposer la membrane sur la gélose, en veillant à ce que le contact soit parfait.
- Incuber à  $36 \pm 2$  °C pendant 8 à 11 jours.

**Eaux sales**

Ensemencement direct

- Faire sécher les boîtes pré-coulées de gélose GVPC (BM071 ou BM227) à l'étuve, couvercle entrouvert.
- Ensemencer 0,2 mL de l'échantillon d'eau et de la dilution au 1/10e à l'aide d'un étaleur stérile.
- Incuber à  $36 \pm 2$  °C pendant 8 à 11 jours.

✓ **Ensemencement :**  
Direct : 0,2 mL  
Après concentration  
Direct : 0,1 mL  
Traitement acide : 0,2 mL  
Traitement thermique : 0,1mL  
Traitement associé : 0,2 mL

✓ **Incubation :**  
8 à 11 jours à 36 °C

Concentration par filtration ou par concentration

- Faire sécher les boîtes pré-coulées de gélose GVPC (BM071 ou BM227) à l'étuve, couvercle entrouvert.
  - Effectuer une concentration de 500 mL de l'échantillon par filtration ou centrifugation. Puis reprendre l'échantillon dans 5 mL d'eau purifiée.
  - Ensemencer 0,1 mL du concentrât à l'aide d'un étaleur stérile à la surface d'une boîte de gélose GVPC (BM071 ou BM227).
  - Ajouter un même volume de tampon acide pH 2.0 à un volume de concentrât et laisser en contact 5 min.
  - Ensemencer rapidement par étalement 0,2 mL sur une boîte.
  - Placer un volume de concentrât dans un bain thermostaté à  $50 \pm 1$  °C pendant 30 minutes.
  - Etaler 0,1 mL à la surface d'une autre boîte de gélose GVPC (BM071 ou BM227).
  - Avec une autre partie du concentrât, réaliser le traitement associé, en commençant par le traitement thermique puis en réalisant le thermique acide.
  - Etaler 0,2 mL à la surface d'une autre boîte de gélose GVPC (BM071 ou BM227).
- Incuber toutes les boîtes à  $36 \pm 2$  °C pendant 8 à 11 jours.

**6 LECTURE**

Au cours de la période d'incubation, examiner les boîtes à partir du quatrième jour et à intervalles réguliers.

Les colonies de *Legionella* spp. ont une coloration blanche à grise. Elles peuvent également être bleues, roses, pourpres, marrons, vert jaune ou rouge foncé et devenir blanchâtres et/ou filamenteuses en vieillissant. Elles peuvent présenter un aspect de verre pilé à la loupe binoculaire. Certaines colonies présentent une fluorescence d'un blanc brillant sous lampe de Wood.

Dénombrer chaque type de colonies séparément.

Repiquer chaque type de colonie sur une boîte de milieu BCYE sans cystéine (BM073) et une boîte de milieu BCYE $\alpha$  (BM072).

Considérer comme *Legionella* toutes les colonies qui se développent sur le milieu BCYE avec cystéine mais ne cultivent pas sur le milieu BCYE sans cystéine.

Identifier les espèces de *Legionella* par sérologie.

Voir ANNEXE 1 : SUPPORT PHOTO.

## 7 CONTROLE QUALITE

**Milieu préparé en boîtes** : gélose noire, avec particules de charbon actif.

Réponse culturale à 36 °C (NF EN ISO 11133) :

Microorganismes		Croissance (Rapport de productivité : $P_R$ )
(1) <i>Legionella pneumophila</i>	WDCM 00107	$P_R \geq 70 \%$
(1) <i>Legionella pneumophila</i>	WDCM 00180	$P_R \geq 70 \%$
(1) <i>Legionella anisa</i>	WDCM 00106	$P_R \geq 70 \%$
(2) <i>Escherichia coli</i>	WDCM 00012	Partiellement à totalement inhibée, score 0-1
(2) <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	WDCM 00025	Partiellement à totalement inhibée, score 0-1
(2) <i>Enterococcus faecalis</i>	WDCM 00087	Totalement inhibée, score 0

(1) après 5 jours d'incubation

(2) après 3 jours d'incubation

## 8 CONSERVATION

**Milieu pré-coulé en boîtes de Petri** : 2-8 °C.

La date de péremption est mentionnée sur l'étiquette.

## 9 PRESENTATION

**Milieu pré-coulé en boîtes de Petri (Ø 90 mm)** :

Coffret de 20 boîtes ..... BM07108

Coffret de 120 boîtes ..... BM22708

## 10 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

McDade, J.E., Shepard, C.C., Faser, D.W. et al.. 1977. Legionnaires' disease : isolation of a bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease. *New England Journal of Medicine*, **297** : 1197-1203.

Feeley, J.C., Gorman, G.W., Weaver, R.E., Mackel, D.C. and Smith, H.W.. 1978. Primary isolation media for Legionnaires disease bacterium. *Journal of Clinical Microbiology*, **8** : 320-325.

Weaver, R.E. and Feeley, J.C. 1979. Cultural and biochemical characterization of Legionnaires' disease bacterium. In *Legionnaires', the Disease, the Bacterium, and Methodology*. Centers for Disease Control, Atlanta, GA. pp 20-25.

Eeley, J.C., Gibson, R.J., Gorman, G.W., Langford, N.C., Rasheed, J.K., Mackel, D.C. and Baine, W.B.. 1979. Charcoal-yeast extract agar: primary isolation medium for *Legionella pneumophila*. *Journal of Clinical Microbiology*, **10** : 437-441.

Pasculle, A.W., Feeley, J.C., Gibson, R.J., Cordes, L.G., Myerowitz, R.L., Patton, C.M., Gorman, G.W., Carmack, C.L., Ezzell, J.W. and Dowling, J.N.. 1980. Pittsburgh pneumonia agent: direct isolation from human lung tissue. *Journal of Infectious Diseases*, **141** : 727-732.

Edelstein, P.H.. 1981. Improved semiselective medium for isolation of *Legionella pneumophila* from contaminated clinical and environmental specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, **14** : 298-303.

Wadowsky, R.M. and Yee, R.B.. 1981. Glycine-containing selective medium for isolation of *Legionellaceae* from environmental specimens. *Applied and Environmental Microbiology*, **42** : 768-772.

Dennis, P.J.L., Bartlett, C.L.R. and Wright, A.E.. 1984. Comparison of isolation methods for *Legionella* spp. In *Thornsbury, C. et al. (ed.) Legionella : Proceedings of the 2<sup>nd</sup> International symposium Washington D.C.* American Society for Microbiology, p 294-296.

Journal Officiel du 31 décembre 2004. Arrêté du 13 décembre 2004 relatif aux installations de refroidissement par dispersion d'eau dans un flux d'air soumises à autorisation au titre de la rubrique n° 2921.

FD T90-522. Juillet 2006. Qualité de l'eau. Guide technique de prélèvement pour la recherche de *Legionella* dans les eaux.

NF EN ISO 11133. Juillet 2014. Microbiologie des aliments, des aliments pour animaux et de l'eau - Préparation, production, stockage et essais de performance des milieux de culture (Tirage 2 (2016-01-01)).

NF EN ISO 11731. Juillet 2017. Qualité de l'eau. Dénombrement des *Legionella*.

NF T 90-431. Août 2017. 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.

NF EN ISO 11133/A1. Mars 2018. Microbiologie des aliments, des aliments pour animaux et de l'eau - Préparation, production, stockage et essais de performance des milieux de culture. Amendement 1.

## 11 AUTRES INFORMATIONS

---

Les mentions portées sur les étiquettes sont prédominantes sur les formules ou les instructions décrites dans ce document et sont susceptibles d'être modifiées à tout moment, sans préavis.

Code document : GVPC GELOSE\_FR\_V9.

Date création : 04-2004

Date de révision : 03-2021

Motif de révision : Ajout d'une nouvelle référence correspondant à un nouveau conditionnement

## ANNEXE 1 : SUPPORT PHOTO

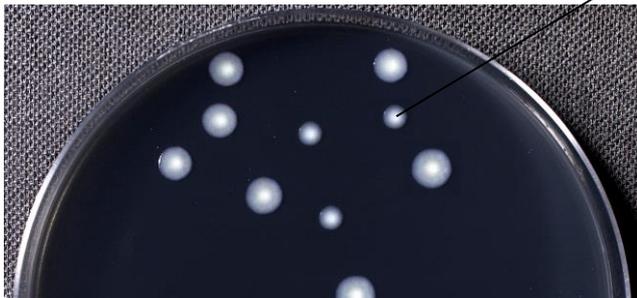
---

### Gélose sélective GVPC pour *Legionella*

Détection et dénombrement des *Legionella*.

#### Lecture :

Croissance obtenue après 10 jours d'incubation à 36 °C.



#### *Legionella pneumophila*

Colonie caractéristique :  
De couleur blanche à grise avec une surface lisse ; présente parfois un aspect de verre pilé à la loupe binoculaire.

**Notes :** Les colonies de *Legionella* qui se développent sur des membranes filtrantes blanches ont un aspect différent de celles qui se développent sur un fond noir