
GELOSES BCYE AVEC ET SANS CYSTEINE

DENOMBREMENT ET CONFIRMATION DES *LEGIONELLA*

1 DOMAINE D'UTILISATION

Les géloses BCYE avec cystéine et BCYE sans cystéine sont utilisées pour la confirmation des colonies présomptives de *Legionella* spp. dans les échantillons d'eau et les autres prélèvements susceptibles d'en contenir.

La gélose BCYE avec cystéine peut également être utilisée pour le dénombrement des *Legionella* spp. dans les échantillons d'eau.

La formule-type des géloses répond à la composition définie dans les normes pour le contrôle des eaux NF EN ISO 11731 et NF T 90-431.

2 HISTORIQUE

En 1977, MacDade *et al.* furent les premiers à isoler l'agent responsable de la maladie des légionnaires, une bactérie maintenant appelée *Legionella pneumophila*. Après cette découverte, de nombreuses *Legionella* ont été trouvées dans des environnements aquatiques d'eau douce : circuits de distribution d'eau, systèmes de climatisation, tours de refroidissement, eaux thermales. On dénombre actuellement 48 espèces de *Legionella*.

En 1978, Weaver réussit à cultiver des *Legionella* sur une gélose Mueller-Hinton chocolat. Feeley *et al.* en déduisirent 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 CO₂ 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.

Et en 1981, Edelstein a augmenté la sensibilité du milieu en y ajoutant de l' α -cétoglutarate (milieu BCYE α). On considère comme *Legionella* toutes les colonies qui se développent sur le milieu BCYE α , mais ne cultivent pas sur le milieu BCYE α sans cystéine (BCYE α - cys).

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' α -cétoglutarate est un activateur de la croissance des *Legionella*.

4 FORMULES-TYPE

Les compositions peuvent être ajustées de façon à obtenir des performances optimales.

Gélose BCYE avec cystéine

Pour 1 litre de milieu :

- Extrait autolytique de levure 10,0 g
- Charbon actif 2,0 g
- α -cétoglutarate, sel monopotassique 1,0 g
- ACES 10,0 g
- Hydroxyde de potassium 2,8 g
- Pyrophosphate ferrique 0,25 g
- Agar agar bactériologique 12,0 g
- L-cystéine, chlorhydrate 0,4 g

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

Gélose BCYE sans cystéine

Pour 1 litre de milieu :

- Extrait autolytique de levure 10,0 g
- Charbon actif 2,0 g
- α -cétoglutarate, sel monopotassique 1,0 g
- ACES 10,0 g
- Hydroxyde de potassium 2,8 g
- Pyrophosphate ferrique 0,25 g
- Agar agar bactériologique 12,0 g

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

5 MODE D'EMPLOI

Dénombrement des *Legionella* selon NF EN ISO 11731 :

Echantillons ayant une forte concentration en *Legionella* ($>10^4$ ufc/L) et une faible concentration en microorganismes interférents :

- Etaler 0,1 ml à 0,5 ml de l'échantillon sur une boîte de gélose BCYE (BM072) et sur une boîte de gélose BCYE+AB.
- Incuber à 36 ± 2 °C pendant 7 à 10 jours.

✓ **Ensemencement :**
Selon le protocole approprié

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

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 BCYE+AB.

Echantillon concentré après lavage et traitements :

- Procéder au lavage des autres membranes afin d'obtenir un échantillon concentré.
- Répartir le concentré obtenu en 3 portions : non-traitée, traitée à l'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.

Confirmation des *Legionella* selon les normes NF EN ISO 11731 et T 90-431 :

- Repiquer chaque type de colonie sur une boîte de milieu BCYE sans cystéine (BM073) et une boîte de milieu BCYE avec cystéine (BM072).
- Incuber à 36 ± 2 °C pendant 2 à 5 jours.

✓ **Ensemencement :**
En surface

✓ **Incubation :**
2 à 5 j à 36 ± 2 °C

6 LECTURE

Les colonies de *Legionella* spp. présentent une coloration blanche à grise sur le milieu BCYE avec cystéine (BM072). Elles peuvent également être bleues, roses, pourpres, marrons, vert jaune ou rouge foncé et devenir blanchâtres et/ou filamenteuses en vieillissant. Leur surface est lisse et leur bord est bien net. 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.

La présence de colonies sur le milieu BCYE avec cystéine (BM072) combinée avec l'absence de colonies sur le milieu BCYE sans cystéine (BM073) permet de conclure à la présence de *Legionella*.

Voir ANNEXE 1 : SUPPORT PHOTO.

7 CONTROLE QUALITE

Gélose BCYE avec cystéine (BM072)

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

Réponse culturale typique après 72 heures d'incubation à 36 °C (NF EN ISO 11133) :

Microorganismes		Croissance (Rapport de productivité : P_R)
<i>Legionella pneumophila</i>	WDCM 00107	$P_R \geq 70 \%$ Positive
<i>Escherichia coli</i>	WDCM 00179	

Gélose BCYE sans cystéine (BM073)

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

Réponse culturale typique après 72 heures d'incubation à 36 °C (NF EN ISO 11133) :

Microorganismes		Croissance
<i>Legionella pneumophila</i>	WDCM 00107	Négative
<i>Escherichia coli</i>	WDCM 00179	Positive

8 CONSERVATION

Milieus complets pré-coulés : 2-8 °C.

Les dates de péremption sont mentionnées sur les étiquettes.

9 PRESENTATION

Gélose BCYE avec cystéine, pré-coulé en boîtes de Petri (ø 90 mm)

Coffret de 20 boîtes BM07208

Gélose BCYE sans cystéine, pré-coulé en boîtes de Petri (ø 90 mm)

Coffret de 20 boîtes BM07308

10 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

McDade, J.E., Shepard, C.C., Fraser, D.W. et al. 1977. Legionnaires' disease. Isolation of a bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease. N. Engl. J. Med., 297 : 1197-1203.

Feeley, J.C., Gorman, G.W., Weaver, R.E., Mackel, D.C., and Smith, H.W. 1978. Primary isolation media for the Legionnaires' disease bacterium. J. Clin. Microbiol., 8 : 320-325.

Weaver, R.E., and Feeley, J.C. 1979. Cultural and biochemical characterisation of legionnaires disease bacterium. 'Legionnaires', the bacterium and methodology. Center for Disease Control, Atlanta GA. p 19-25.

Feeley, 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*. J. Clin. Microbiol., 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. J. Infect. Dis., 141 : 727-732.

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

Wadowsky, R.W. and Yee, R.B. 1981. Glycine-containing selective medium for isolation of *Legionellaceae* from environmental specimens. Appl. and Environ. Microbiol., 42 : 768-772.

Dennis, P.J.L., Bartlett, C.L.R. and Wright, A.E. 1984. Comparison of isolation methods for *Legionella* spp. In Thornsby, C. et al. (ed.) *Legionella* : Proceedings of the 2nd International symposium Washington D.C. Am. Soc. Microbiol., 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 T 90-522. Juillet 2006. Qualité de l'eau. Guide technique de prélèvement pour la recherche de *Legionella* dans les eaux.

NF EN 13623. Mai 2011. Antiseptiques et désinfectants chimiques - Essai quantitatif de suspension pour l'évaluation de l'activité bactéricide contre des legionelles des désinfectants chimiques pour les systèmes aqueux - Méthode d'essai et prescriptions (phase 2, étape 1).

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 : BCYE GELOSES_FR_V3

Date création : 05-2012

Date de révision : 02-2019

Motif de révision : Mise à jour mode d'emploi, Références bibliographiques.

Géloses BCYE et BCYE sans cystéine

Confirmation de *Legionella*.

Lecture :

Croissance obtenue après 4 jours d'incubation à 36 °C.



Legionella pneumophila

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

Microorganismes	Croissance sur le milieu BCYE	Croissance sur le milieu BCYE sans cystéine
<i>Legionella</i>	Colonies blanches à grises avec une surface lisse.	Absence de colonie