

~~~~~

***Bepaling van Legionella pneumophila en  
Legionella species***

~~~~~

**INHOUD**

<b>1</b>	<b>TOEPASSINGSGBIED</b> .....	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>PRINCIPE</b> .....	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>OPMERKINGEN</b> .....	<b>4</b>
<b>4</b>	<b>APPARATUUR EN MATERIAAL</b> .....	<b>4</b>
4.1	APPARATUUR .....	5
4.2	MATERIAAL.....	5
<b>5</b>	<b>REAGENTIA EN BEREIDINGEN</b> .....	<b>5</b>
5.1	REAGENTIA .....	5
<b>6</b>	<b>PROCEDURE</b> .....	<b>6</b>
6.1	BEMONSTERING.....	6
6.2	MONSTERVOORBEREIDING .....	8
6.3	NEN 6265 METHODE .....	8
6.3.1	<i>Isolatie uit een watermonster met een hoge concentratie Legionella</i> .....	8
6.3.2	<i>Isolatie van Legionella uit een watermonster met veel of weinig storende flora</i> .....	8
6.3.3	<i>Aflezen van de platen</i> .....	9
6.3.4	<i>Bevestiging van presumptieve Legionellakolonies</i> .....	9
6.4	ISO 11731 METHODE.....	10
6.4.1	<i>Rechtstreeks uitplating</i> .....	10
6.4.2	<i>Membraanfiltratie</i> .....	10
6.4.3	<i>Isolatie</i> .....	10
6.4.4	<i>Behandelingen</i> .....	10
6.4.5	<i>Interpretatie en telling</i> .....	11
6.4.6	<i>Bevestiging van presumptieve Legionella kolonies</i> .....	11
6.5	SPECIFIEKE METHODE VOLGENS ISO 11731-2 (LAGE BACTERIE TELLINGEN) .....	11
6.5.1	<i>Membraanfiltratie</i> .....	11
6.5.2	<i>Interpretatie</i> .....	12
6.5.3	<i>Bevestiging van presumptieve Legionella kolonies</i> .....	12
6.6	SEROLOGISCHE BEVESTIGING .....	12
<b>7</b>	<b>KWALITEITSCONTROLE</b> .....	<b>12</b>
<b>8</b>	<b>RAPPORTERING</b> .....	<b>13</b>
8.1	NEN 6265 EN ISO 11731 METHODE .....	13
8.2	ISO 11731-2 VOOR LAGE BACTERIEAANTALLEN .....	14
<b>9</b>	<b>REFERENTIES</b> .....	<b>14</b>

## 1 TOEPASSINGSGEBIED

Deze procedure beschrijft methodes voor het aantonen en kwantificeren van *Legionella* in water. Karakteristieke kolonies worden nader onderzocht door het uitvoeren van bevestigings- en typeringsreacties.

Deze procedure is van toepassing bij het bacteriologisch onderzoek van -al dan niet verwarmd- water, tenzij de aard en/of het gehalte aan zwevende stof en/of begeleidende flora de bepaling verstoort.

Afhankelijk van de oorsprong van het monster en het te verwachten aantal bacteriële flora komen volgende analysemethodes in aanmerking:

- Methode voor detectie en telling van *Legionella* in watermonsters waarin weinig storende flora verwacht wordt. Deze methode is gebaseerd op de NEN 6265 norm.
- Methode voor watermonsters waarvan geweten is dat een heel hoog *Legionella*-aantal kan worden verwacht en / of daarbij veel storende flora (bvb.: watermonsters van koeltorens): methode volgens NEN 6265 of ISO 11731.
- Specifieke methode voor watermonsters met een laag bacterie- en *Legionella*-aantal (bvb. koud leidingswater): methode volgens ISO 11731-2.

Aanvulling bij deze methodes conform het *Legionella*-Besluit van februari 2007  
Aanvullend aan de bevestigingstest dient een serologische typering te worden uitgevoerd daar de criteria in het *Legionella*-Besluit vastgelegd zijn voor de parameter *Legionella pneumophila*. Er dient dus een onderscheid gemaakt te worden op species niveau aan de hand van een serologische kit voor *Legionella pneumophila* serotype 1 en 2-14 (2-15<sup>1</sup>) en *Legionella species* (verschillend van *pneumophila*)<sup>2</sup>.

Theoretisch kan het aantal kolonievormende eenheden gelijk aan de numerieke waarde van de detectielimiet per onderzocht volume water bepaald worden. Door de aanwezigheid van stoorflora en andere matrixinvloeden is dit niet altijd het geval.

## 2 PRINCIPE

Bacteriën uit de familie *Legionellaceae* zijn staafvormige (2-20 µm lang en 0,3-0,9 µm dik), Gramnegatieve beweeglijke bacteriën die sporen noch cysten vormen. Het organisme groeit enkel in een zuurstofhoudend milieu en heeft onder andere het zwavelhoudende aminozuur L-cysteïne nodig.

- NEN 6265 en ISO 11731 methode

Het monster wordt geconcentreerd op een geschikte membraanfilter. Indien heel hoge concentraties *Legionellabacteriën* verwacht worden, kan het monster ook rechtstreeks uitgeplaat worden. Van het concentraat van de afgewassen filter wordt, om de groei van stoorflora te reduceren, porties onderworpen aan een warmtebehandeling (NEN 6265 en ISO 11731) en een zuurbehandeling (ISO 11731). De behandelde porties of het ongefilterd

<sup>1</sup> Afhankelijk van de producent van de serologische kit

<sup>2</sup> *Leg. pneumophila* serotype 1 is de meest belangrijke oorzaak van legionellose er wordt dus beschouwd als het meest kritische type *Legionella* te vinden in een watermonster. Sinds het toenemend aantal gevallen van legionellose veroorzaakt door andere serotype en *L. pneumophila* en andere *Legionella species* worden andere *Legionella species* in water ook als potentieel risico beschouwd.

monster worden geïnoculeerd op een vaste, selectieve voedingsbodems om de *Legionellabacteriën*, na incubatie, als karakteristieke kolonies te herkennen, gebaseerd op hun vereiste van L-cysteïne en ijzer. Ter bevestiging wordt nader onderzoek gedaan naar het onvermogen van deze kolonies om te kunnen groeien op een medium zonder L-cysteïne. De verdere serotypering gebeurt met behulp van een *Legionella* agglutinatietest.

- specifieke methode voor lage bacterieaantallen volgens ISO 11731-2

Concentratie van het monster geschiedt op een geschikte membraanfilter. Na filtratie wordt het membraan in de filterhouder rechtstreeks met een zure buffer behandeld om de groei van bacteriën verschillend van *Legionella* te reduceren. De filter wordt rechtstreeks geïncubeerd op een vaste, selectieve voedingsbodem voor *Legionellabacteriën*. Presumptieve kolonies worden bevestigd op vaste, selectieve voedingsbodems om de *Legionellabacteriën* hun L-cysteïne- en ijzerbehoefte aan te tonen en zo als karakteristieke kolonies te herkennen. De serologische bevestiging gebeurt met behulp van een *Legionella* agglutinatietest.

- specifieke methode voor watermonsters afkomstig van koeltorens en klimaatregelingsystemen volgens NF T 90-431 en PR NF T90-431/A1

Voor deze specifieke zwaar beladen watermonsters wordt verwezen naar deze Franse norm. Het monster wordt geconcentreerd via membraanfiltratie, en porties van deze suspensie worden onderworpen aan een warmtebehandeling, een zuurbehandeling en een gecombineerde warmte- en zuurbehandeling. Deze dubbele behandeling verhoogt de mogelijkheid om interpreteerbare resultaten te genereren.

### 3 OPMERKINGEN

*Legionellabacteriën* zijn pathogene klasse twee micro-organismen, die vooral een gevaar betekenen wanneer ze aanwezig zijn in aërosolen, en als dusdanig een mogelijke bron zijn voor besmetting bij inademing.

Alle manipulaties -behalve het filtreren zelf- worden uitgevoerd in een veiligheidskabinet (4.1.8). Tijdens het filtreren wordt daarom een aërosolveilige masker gedragen.

De besmette vaste afval (petriplaten, doekjes, pipettips...) worden in een speciaal daartoe bestemde container verwijderd. Na het waarnemen van de resultaten worden de resterende monsters en suspensies behandeld en verwijderd als vloeibare bacterieafval.

Glaswerk dat gecontamineerd is met klasse twee bacteriën wordt vóór de afwas eerst geautoclaveerd (4.1.1).

Elk werkoppervlak wordt voor en na gebruik ontsmet met 2,5% Umonium<sup>38</sup> (5.1.3) en nadien met 70% gedenatureerde ethanol (5.1.4).

Vóór het enten van agarmedia in petriplaten, enkel indien nodig, dient het oppervlak van de agarplaten gedroogd te worden. Hiervoor worden de platen, met de agarbodem naar boven, dakpansgewijs van het deksel geplaatst en gedroogd in een veiligheidskabinet (4.1.8) **of in een droogstoof**. Afhankelijk van de periode vanaf de bereidingsdatum tot het in gebruik nemen van de platen, kan de droogtijd variëren (15±20 minuten).

### 4 APPARATUUR EN MATERIAAL

## 4.1 Apparatuur

- 4.1.1 Autoclaaf  $121 \pm 3^\circ\text{C}$
- 4.1.2 Incubator  $36 \pm 2^\circ\text{C}$
- 4.1.3 Waterbad  $50 \pm 1^\circ\text{C}$
- 4.1.4 Schudtoestel
- 4.1.5 Vortex
- 4.1.6 Ultrasoonbad
- 4.1.7 Kolonietelapparaat
- 4.1.8 Veiligheidskabinet
- 4.1.9 Koelkast  $5 \pm 3^\circ\text{C}$
- 4.1.10 Filtratietoestel met pomp
- 4.1.11 Pipetus accu

## 4.2 Materiaal

- 4.2.1 Steriele flessen
- 4.2.2 Flessen verpakt in (aluminium)folie en gesteriliseerd
- 4.2.3 Thermometer
- 4.2.4 Pincet
- 4.2.5 Steriele nylon of polycarbonaat 0,2 of 0,45  $\mu\text{m}$  membraanfilters
- 4.2.6 Steriele zwarte nitrocellulose 0,45  $\mu\text{m}$  membraanfilters
- 4.2.7 Steriele (centrifuge) buisjes
- 4.2.8 Steriele flesjes met brede hals en een bodemlaag ( $\pm 10\text{g}$ ) glasparels diameter 3 mm
- 4.2.9 Instelbare pipetten en steriele tips met filter
- 4.2.10 Wegwerppipetten
- 4.2.11 Entnaald met Pt-öse
- 4.2.12 Drigalski spatel
- 4.2.13 Stereomicroscoop

## 5 REAGENTIA EN BEREIDINGEN

### 5.1 Reagentia

- 5.1.1 Natriumthiosulfaat oplossing 1,8%
- 5.1.2 Ringer 1/40 oplossing (of gelijkwaardig diluent)
- 5.1.3 Umonium<sup>38</sup> 2,5% (of gelijkwaardig biocide)
- 5.1.4 Gedenatureerde ethanol 70% (of gelijkwaardig)
- 5.1.5 Legionella BCYE zonder L-cysteïne (BCYE-cys)
- 5.1.6 Legionella BCYE + L-cysteïne (BCYE+cys)
- 5.1.7 Legionella BCYE + antibiotica (BCYE+ab)
- 5.1.8 Type MWY
- 5.1.9 Type GVPC
- 5.1.10 Legionella zure buffer
- 5.1.11 Legionella serologische kit
- 5.1.12 Legionella pneumophila referentiebacterie

## 6 PROCEDURE

### 6.1 Bemonstering

De bemonstering bij *Legionella* onderzoek gebeurt conform de norm ISO 19458:2006 betreffende monsternamen voor microbiologisch onderzoek, met bijkomende richtlijnen specifiek voor watermonsters afkomstig van koeltorens en klimaatregelingsystemen. Voor aanvang van de monsternamen wordt overlegd welke doel en aanpak van bemonstering aan welke tappunten dient te worden uitgevoerd:

- Voor de bepaling van de kwaliteit van drinkwater in de hoofdleidingen van het distributienet zie Tabel 1
- Voor beoordeling van de kwaliteit van drinkwater uit een tappunt ter consumptie, zoals geleverd aan de (hoofd-)kraan (dat nadien nog kan veranderd worden door de netvoorziening binnen een gebouw) zie Tabel 1
- Voor beoordeling van de kwaliteit van drinkwater bij consumptie, zoals beschikbaar aan de (mogelijks gecontamineerde) kraan zie Tabel 1 (in het kader van gezondheidsbeleid)

**Tabel 1 Monsternamen aan een tappunt van drinkwater voor verschillende doeleinden**

Doel	Type water	Verwijderen van koppelingsstukken	Tappunt ontsmetten	flushen
a)	<u>in de hoofdleidingen van het distributienet</u>	ja	ja	ja
b)	<u>zoals geleverd aan de (hoofd-)kraan</u>	ja	ja	nee <sup>x</sup> (minimaal)
c)	<u>zoals bij consumptie</u>	nee	nee	nee

<sup>x</sup> Korte flush enkel om de invloed van de ontsmetting van de kraan te niet te doen

Afhankelijk van de opzet van de monsternamen is het nodig of incorrect dat de koppelingsstukken worden verwijderd, of dat het tappunt wordt ontsmet of geflushed.

Monsters ter beoordeling van de hoofdleidingen a) dienen bij voorkeur genomen te worden aan specifieke tappunten (ook in het distributienet) die zich het dichtst bij de hoofdleidingen van het distributienet bevinden, proper zijn, vrij van koppelingsstukken en die ontsmet worden via flamberen of via een geschikt desinfectans. Het tappunt wordt kort bij vol debiet geopend, dit om het vuil van de tap te verwijderen en micro-organismen onder vorm van biofilmfragmenten te verwijderen. Nadien wordt het tappunt ontsmet. Daaropvolgend wordt het tappunt bij half debiet geopend, het water wordt geflushed tot constante temperatuur en een watermonster wordt aseptisch opgevangen in steriele flessen (4.2.1).

De omschrijving van bemonstering b) in

Tabel 1 is de methode voor de kwaliteit van het drinkwater te beoordelen met inbegrip van de invloed van de netvoorziening binnenin het gebouw. In dergelijk geval is het mogelijk dat de tappunten niet te ontsmetten zijn via flamberen, zodat

het gebruik van desinfectans aangewezen is. Het tappunt wordt na ontsmetting minimaal geflushed om de invloed van het thermisch effect van het flamberen of resten van het aangewend desinfectans te verwijderen. Het water wordt onmiddellijk bemonsterd in steriele flessen (4.2.1) zonder het sluiten en het heropenen van het tappunt.

De omschrijving van c) in Tabel 1 is de methode voor de kwaliteit van het drinkwater te beoordelen in bijzondere situaties zoals tijdens een uitbraak. Een monster wordt genomen in steriele flessen (4.2.1) zonder flushen, zonder het tappunt te ontsmetten, noch koppelingsstukken te verwijderen.

In de flessen voor bemonstering van drinkwater wordt vóór of na sterilisatie, maar zeker vóór bemonstering 1 ml/L 1,8% natriumthiosulfaat (5.1.1) toegevoegd.

- d) Voor de monstername van dompelsonsters in therapiebaden en whirlpools hoort de volgende aanpak. Steriele flessen (4.2.2) worden gebruikt die vóór sterilisatie verpakt zijn in aluminium- of autoclaveerbare folie.

Manuele bemonstering: de folie rond de steriele fles wordt pas geopend net de vóór bemonstering en de fles wordt op de binnenkant van de folie gelaten. Nadat steriele handschoenen zijn aangetrokken wordt de gesloten fles rechtstreeks met steriele handschoenen ondergedompeld tussen 10-30 cm onder het waterniveau. De fles wordt schuin gehouden, wordt geopend, laten vullen tot de flessenhals (dus niet volledig vol) en de fles wordt terug afgesloten.

Met monstername-apparaat: de folie wordt pas geopend net voor de bemonstering en wordt gebruikt als een soort "handschoen" zodat de binnenkant van de folie en de fles niet worden aangeraakt. Vervolgens wordt de fles aangebracht in een monstername-apparaat dat toelaat een watermonster te nemen bij een bepaalde diepte. Het dompelsonster wordt genomen tussen 10-30 cm onder het waterniveau. Er wordt in de fles een luchtfase voorzien om het monster voldoende te kunnen mengen vóór analyse. De temperatuur van het water wordt gemeten en genoteerd. Voor de monstername wordt 500ml of 1000ml water bemonsterd in een steriele glazen fles (4.2.1), en wordt de opzet van de monstername genoteerd op het monsternameformulier.

Aan de flessen bestemd voor bemonstering van therapiebaden en whirlpools / bubbelbaden wordt **na bemonstering** 2 ml/L 1,8% natriumthiosulfaat (5.1.1) toegevoegd. ~~Bij het nemen van de dompelsonsteren wordt bijzonder aandacht geschonken dat het aanwezige thiosulfaat niet verloren gaat tijdens de bemonstering.~~

- e) Voor monstername van watermonsters van koeltorens en klimaatregelingsystemen: het doel dat wordt geogd is een monster te nemen waar het water de hoogste temperatuur heeft. De bemonstering gebeurt dus aan de toevoerleiding naar de koeltoren, aan de uitgang van de warmtewisselaar (condensor), die door de koeltoren gekoeld wordt. Indien op de leiding tussen de warmtewisselaar en de koeltoren geen kraan voorzien is, wordt er een dompelsonster (zie punt d) voor de uitvoering) in de vergaarbassin genomen.

Voor aanvang van de monstername wordt genoteerd aan welke tappunt de bemonstering wordt uitgevoerd. Indien watermonsters gechlloreerd, gebromeerd of gezoniseerd zijn, wordt in het recipiënt vóór sterilisatie natriumthiosulfaat (5.1.1) toegevoegd. **Voor de dompelsonsters wordt na bemonstering natriumthiosulfaat gedoseerd.** Indien natriumthiosulfaat is gebruikt, of indien gekend is dat er biocides,



anticorrosie en of antifouling producten in het circuit van de installatie worden gebruikt, wordt dit eveneens genoteerd.

Indien een dompelmonster wordt genomen wordt de temperatuur van het water in het gevuld recipiënt gemeten en genoteerd. Indien de bemonstering aan een tappunt gebeurt wordt dit punt niet geflambeerd. Water laten lopen tot gestabiliseerde (lees constante) temperatuur, temperatuur wordt afgelezen en genoteerd op het formulier, en bij voorkeur wordt 1 liter, of een minimum volume van 500 ml monster genomen in een steriele fles (4.2.1). Hierbij wordt de dop van het recipiënt steeds in de hand gehouden met de opening naar boven.

Bij elke bemonstering wordt elke aangewende fles voorzien van een etiket waarop duidelijk een identificatienummer wordt genoteerd. Op een monsternamiformulier worden naast het identificatienummer de plaats, datum en tijdstip van monsternamie, monsternemer, de temperatuur van het monster bij de bemonstering, het doeleind en dus de aanpak, en eventuele opmerkingen genoteerd.

Monsters worden koel getransporteerd. Monsters met een hoge temperatuur worden fysisch gescheiden van koude monsters. Een monster wordt bij aankomst in het laboratorium onmiddellijk geanalyseerd, zoniet wordt het in een koelkast  $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$  (4.1.9) gestockeerd en binnen 24 uur onderzocht (NEN 6265) en zeker niet langer dan 2 dagen na monsternamie (ISO 11731).

## 6.2 Monstervoorbereiding

Een monster wordt gehomogeniseerd door de fles grondig te schudden ofwel door de fles op een schudtoestel (4.1.4) te brengen en gedurende de voorbereidingen van de analyses te schudden.

## 6.3 NEN 6265 methode

### 6.3.1 Isolatie uit een watermonster met een hoge concentratie Legionella

Van een watermonster dat vermoedelijk een hoge concentratie aan *Legionella* bevat worden rechtstreekse uitplantingen van het watermonster geanalyseerd. Per plaat wordt 0,1 ml (4.2.9) van het monster gespateld met een steriele drigalski (4.2.12) over 2 BCYE+cys platen (5.1.6), 2 BCYE+ab platen (5.1.7) en 1 BCYE-cys plaat (5.1.5).

Pasteuriseren van 5 ml monster gedurende  $30 \pm 2$  min in het waterbad van  $50^{\circ}\text{C}$  (4.1.3). Per plaat wordt 0,1 ml (4.2.9) van dit gepasteuriseerd monster gespateld met een steriele drigalski (4.2.12) over 2 BCYE+cys platen (5.1.6), 2 BCYE+ab platen (5.1.7) en 1 BCYE-cys plaat (5.1.5).

De platen worden verpakt in plastic zakken of dozen tegen uitdroging. Incubatie van de platen gedurende ten minste 7 dagen en ten hoogste 10 dagen bij  $36 \pm 2^{\circ}\text{C}$  (4.1.2).

### 6.3.2 Isolatie van Legionella uit een watermonster met veel of weinig storende flora

#### 6.3.2.1 membraanfiltratie

De membraanfiltratie wordt uitgevoerd met een filtratietoestel met pomp (4.1.10). De steriele filtratiekokers worden of zijn voorzien van steriele  $0,2\mu\text{m}$  nylon of polycarbonaat



membraanfilters (4.2.5). Filtratie van 500/250/50ml monster. Van een monster waarin veel storende flora wordt verwacht wordt 50ml van het watermonster gefiltreerd.

### 6.3.2.2 isolatie

Na filtratie wordt de filter met een steriele pincet (4.2.4) aseptisch overgebracht in een steriele fles (4.2.8) gevuld met één laag glaspereels van 3 mm en 5 ml Ringer 1/40 buffer (5.1.2) (of monster of het filtraat ervan). De filter wordt nauwgezet langs het filtratieoppervlak egaal neergelegd op de parels.

Het flesje wordt gedurende 2 minuten in een ultrasoonbad (4.1.6) gebracht om de bacteriën van de filter te lossen.

- van het concentraat van een monster waarin veel storende flora wordt verwacht wordt het flesje gepasteuriseerd gedurende  $30 \pm 2$  min in het waterbad van  $50^\circ\text{C}$  (4.1.3). Telkens na grondig vortexen (4.1.5) wordt per plaat 0,2 ml (4.2.9) van het monster gespateld met een steriele drigalski (4.2.12) over 5 BCYE+ab platen (type MWY (5.1.8)), 5 BCYE+ab platen (type GVPC (5.1.8)) en 1 BCYE-cys plaat (5.1.5). De platen worden verpakt in plastic zakken of dozen tegen uitdroging. Incubatie van de platen gedurende ten minste 7 dagen en ten hoogste 10 dagen bij  $36 \pm 2^\circ\text{C}$  (4.1.1).
- van de suspensie van een monster waarin weinig storende flora wordt verwacht wordt -telkens na grondig vortexen (4.1.5)- per plaat 0,1 ml (4.2.9) gespateld met een steriele drigalski (4.2.12) over 2 BCYE+cys platen (5.1.6), 2 BCYE+ab platen (5.1.7) en 1 BCYE-cys plaat (5.1.5). De resterende suspensie ondergaat een pasteurisatie gedurende  $30 \pm 2$  min in een waterbad van  $50^\circ\text{C}$  (4.1.3). Van de warmtebehandelde suspensie wordt -telkens na grondig vortexen (4.1.5)- per plaat 0,1 ml (4.2.9) gespateld met een steriele drigalski (4.2.12) over 2 BCYE+cys platen (5.1.6), 2 BCYE+ab platen (5.1.7) en 1 BCYE-cys plaat (5.1.5). Alle platen worden ingepakt in plastic zakjes of dozen om uitdroging te vermijden. Incubatie van de platen gedurende ten minste 7 dagen en ten hoogste 10 dagen bij  $36 \pm 2^\circ\text{C}$  (4.1.2).

### 6.3.3 Aflezen van de platen

De platen worden beoordeeld bij voorkeur met een stereomicroscop (4.2.13) op de aanwezigheid van *Legionellakolonies*. Alle presumptieve kolonies worden geteld (4.1.7) en genoteerd.

*Legionellabacteriën* groeien op BCYE+cys en BCYE+ab platen en niet op BCYE-cys. *Legionellabacteriën* hebben een karakteristieke morfologie met een korrelige structuur en een matglazen uitzicht. Er kunnen kleurvariaties voorkomen van melkachtig wit, grijs tot groen of paars. *Legionellakolonies* behorende tot verschillend species en/of serotypes vertonen verschillen in morfologie of kleur. Op die basis kunnen *Legionellakolonies* van verschillende types op eenzelfde of verschillende platen worden onderscheiden.

### 6.3.4 Bevestiging van presumptieve *Legionellakolonies*

De presumptieve *Legionellakolonies* worden bevestigd met de serologische test (zie 6.6 serologische bevestiging).

Indien met de serologische bevestiging geen éénduidige interpretatie mogelijk is worden voor de bevestiging minstens drie presumptieve *Legionellabacteriën* van eenzelfde soort

overgeënt met een entnaald met Pt-öse (4.2.11) op één BCYE+cys platen (5.1.6) en één BCYE-cys plaat (5.1.5).

De platen worden geïncubeerd gedurende ten minste 2 dagen bij  $36 \pm 2^\circ\text{C}$  (4.1.2) tot er groei optreedt. *Legionella* vertoont groei op de BCYE+cys en niet op de BCYE -cys.

De presumptieve *Legionellakolonies* worden herbevestigd met de serologische test (zie 6.6 serologische bevestiging).

## 6.4 ISO 11731 methode

### 6.4.1 Rechtstreeks uitplating

Van een monster dat vermoedelijk een heel hoog aantal *Legionella* bevat worden eerst rechtstreekse uitplatingen van het watermonster geanalyseerd:

van het monster wordt - na grondig schudden - 0,1 ml (4.2.9) gespateld met een steriele drigalski (4.2.12) over een BCYE+ab plaat (5.1.7). Platen worden ingepakt in een plastic zakken of dozen. Incubatie van de agarplaten tot 10 dagen bij  $36 \pm 2^\circ\text{C}$  (4.1.2).

### 6.4.2 Membraanfiltratie

De membraanfiltratie wordt uitgevoerd met een filtratietoestel met pomp (4.1.10). De steriele filtratiekokers worden of zijn voorzien van steriele 0,2 of 0,45µm nylon of polycarbonaat membraanfilters (4.2.5). Filtratie van 1000/500 ml monster.

### 6.4.3 Isolatie

Na filtratie wordt de filter met een steriele pincet (4.2.4) overgebracht in een steriele fles (4.2.8) gevuld met één laag glaspereels van 3 mm en 5 ml Ringer 1/40 buffer (5.1.2). De filter wordt nauwgezet langs het filtratieoppervlak egaal neergelegd op de parels.

Het flesje wordt gedurende 2 minuten in een ultrasoonbad (4.1.6) gebracht om de bacteriën van de filter te lossen.

### 6.4.4 Behandelingen

Van deze suspensie worden porties:

a) warmtebehandeld

Na grondig schudden wordt 1 ml portie gepipetteerd (4.2.9) in een steriel buisje (4.2.7). De suspensie ondergaat een warmtebehandeling gedurende  $30 \pm 2$  minuten in een waterbad van  $50^\circ\text{C}$  (4.1.3). Van deze suspensie wordt - na grondig vortexen (4.1.5) - 0,1 ml (4.2.9) gespateld met een steriele drigalski (4.2.12) over een BCYE+ab plaat (5.1.7).

b) zuurbehandeld

Na grondig schudden wordt 0,5 ml portie gepipetteerd (4.2.9) in een steriel buisje (4.2.7). Hieraan wordt 500µl 1x geconcentreerd zure buffer (5.1.10) toegevoegd. De suspensie laten inwerken gedurende  $5 \pm 0,5$  min. 0,1 ml (4.2.9) van deze suspensie wordt - na grondig vortexen (4.1.5) - gespateld met een steriele drigalski (4.2.12) over een BCYE+ab plaat (5.1.7).

c) onbehandeld

Van de resterende suspensie in het flesje wordt - na grondig vortexen (4.1.5) - 0,1 ml (4.2.9) gespateld met een steriele drigalski (4.2.12) over een BCYE+ab plaat (5.1.7).

Alle platen worden ingepakt in plastic zakjes of dozen om uitdroging te vermijden. Incubatie van de platen tot 10 dagen bij  $36 \pm 2^\circ\text{C}$  (4.1.2).

#### 6.4.5 Interpretatie en telling

De platen worden beoordeeld, bij voorkeur met een stereomicroscop (4.2.13) op de aanwezigheid van *Legionellakolonies*. Alle presumptieve kolonies worden geteld (4.1.7) en genoteerd.

*Legionellabacteriën* hebben een karakteristieke morfologie met een korrelige structuur en een matglazen uitzicht. Er kunnen kleurvariaties voorkomen van melkachtig wit, grijs tot groen, bruin, rood, roze of paars. *Legionella* kolonies behorende tot verschillende species en/of serotype vertonen verschillen in morfologie of kleur. Op die basis kunnen *Legionella* kolonies van verschillende groepen op eenzelfde of verschillende platen worden onderscheiden. Bepaalde species vormen sneller zichtbare kolonies dan andere species. Onder UV-licht ( $360 \pm 20$  nm) autofluoresceren bepaalde *Legionella species*. *Legionella pneumophila* daarentegen autofluoresceert niet.

De verschillende types presumptieve *Legionellakolonies* worden verder bevestigd.

#### 6.4.6 Bevestiging van presumptieve *Legionella* kolonies

De presumptieve *Legionellakolonies* worden bevestigd met de serologische test (zie 6.6 serologische bevestiging).

Indien met de serologische bevestiging geen éénduidige interpretatie mogelijk is worden voor de bevestiging minstens drie presumptieve *Legionellabacteriën* van eenzelfde soort overgeënt met een entnaald met Pt-öse (4.2.11) op één BCYE+cys platen (5.1.6) en één BCYE-cys plaat (5.1.5).

De platen worden geïncubeerd gedurende ten minste 2 dagen bij  $36 \pm 2^\circ\text{C}$  (4.1.2) tot er groei optreedt. *Legionella* vertoont groei op de BCYE+cys en niet op de BCYE -cys.

De presumptieve *Legionella* kolonies worden herbevestigd met de serologische test (zie 6.6 serologische bevestiging).

### 6.5 Specifieke methode volgens ISO 11731-2 (lage bacterie tellingen)

#### 6.5.1 Membraanfiltratie

De membraanfiltratie wordt uitgevoerd met een filtratietoestel met pomp (4.1.10). De steriele filtratiekokers worden voorzien van steriele  $0,45\mu\text{m}$  zwarte nitrocellulose membraanfilters (4.2.6). Filtratie van 10ml tot 1000ml monster. Om de groei van niet-*Legionellabacteriën* te minimaliseren wordt na filtratie van het monster, de filter met een zure buffer (5.1.10) behandeld door  $30 \pm 5$ ml (4.2.10 4.1.11) in de filterkoker te pipetteren en het geheel 5 min te laten ageren. De buffer wordt verwijderd via filtratie door het membraan. De filter wordt nagespoeld met  $20 \pm 5$  ml steriele Ringer 1/40 oplossing (5.1.2). Na filtratie wordt de filter met een steriele pincet (4.2.4) aseptisch overgebracht op een BCYE+cys plaat (5.1.6) (filteroppervlak naar boven) met extra zorg zodat er geen luchtballen tussen filter en agar voorkomen.

De platen worden ingepakt in plastic zakjes of dozen. Incubatie van de petriplaten gedurende 10 dagen bij  $36 \pm 2^\circ\text{C}$  (4.1.2).

### 6.5.2 Interpretatie

Alle presumptieve kolonies op de zwarte filter worden geteld (4.1.7) en genoteerd. Op de filters kunnen de *Legionellabacteriën* kleurvariaties hebben van wit, grijs, blauw paars tot bruin, rosé, limoengroen of dieprood. Ze hebben een karakteristieke korrelige structuur en een matglazen uitzicht. De presumptieve *Legionellakolonies* worden bevestigd.

### 6.5.3 Bevestiging van presumptieve *Legionella* kolonies

Voor de bevestiging worden minstens drie presumptieve *Legionellabacteriën* van eenzelfde soort overgeënt met een entnaald met Pt-öse (4.2.11) op één BCYE+cys platen (5.1.6) en één BCYE-cys plaat (5.1.5). De platen worden geïncubeerd gedurende ten minste 2 dagen bij  $36 \pm 2^{\circ}\text{C}$  (4.1.2) tot er groei optreedt. *Legionella* vertoont groei op de BCYE+cys en niet op de BCYE -cys. De presumptieve *Legionellakolonies* worden bevestigd met de serologische test (zie 6.6).

## 6.6 Serologische bevestiging

Voor de serotypering worden op minstens drie presumptieve *Legionella* bacteriën van eenzelfde soort een *Legionella* agglutinatie test (5.1.11) uitgevoerd. De agglutinatie test voor *Legionella* wordt uitgevoerd volgens de procedure op de bijsluiter. De antilichaampartikels gaan agglutineren in aanwezigheid van specifieke *Legionella* celwandantigenen waarbij duidelijke zichtbare precipitaten worden gevormd. De test dient een indeling in drie groepen toe te laten:

- Legionella pneumophila* serotype 1
- Legionella pneumophila* serotype 2-14 (2-15)
- Legionella species* (verschillend van *pneumophila*).

Alle waarnemingen worden genoteerd.

## 7 KWALITEITSCONTROLE

Inzetten van een blanco controle bij de selectieve media bij elke meetreeks en inzetten van een positieve controle per lot analysemedia. Hiervoor wordt een controlemonster beënt met een referentie- *Legionella pneumophila* - bacterie (5.1.12). De resultaten van de positieve en negatieve controlemonsters worden genoteerd.

Indien onjuiste verdunningen van een monster zijn ingezet of indien de resultaten van de positieve controlemonsters niet aan de vooropgestelde verwachtingen voldoet, of indien de blanco controle een positief resultaat geeft, wordt de proef als niet betrouwbaar beschouwd. De test wordt dan opnieuw uitgevoerd. De analyseverantwoordelijke volgt de test op en beslist over de geldigheid van de resultaten. Validatie van de analysemethode op verschillende matrices: herhaalbaarheid, reproduceerbaarheid en meetonzekerheid testen. De juistheid afleiden uit ringtestresultaten.

## 8 RAPPORTERING

Voor elke analysemethode worden de aantallen gerapporteerd:

- Legionella pneumophila* serotype 1
- Legionella pneumophila* serotype 2-14
- Legionella species* (verschillend van *pneumophila*)

### 8.1 NEN 6265 en ISO 11731 methode

#### Voor rechtstreekse uitplantingen (van 100µl)

Indien de platen een telbaar (van 4 tot 200 kve) aantal bevestigde kve *Legionella* vertoont wordt het hoogste aantal vermenigvuldigd met  $10^4$  per liter gerapporteerd

Indien meer dan 200 kve zijn geteld wordt het resultaat uitgedrukt als:

*Aantal Legionella* >  $2 \cdot 10^6$  kve/liter

#### Voor monsters na concentratie via filtratie

Met de waarden van de serie platen met de hoogste opbrengst aan verdachte en bevestigde *Legionella* kolonies wordt berekend:

$$C = (N \cdot f \cdot V_c) / (V_p \cdot V_m)$$

waarin:

- C is het aantal kve *Legionellabacteriën* per liter
- N is het gemiddelde van het aantal kolonies aanwezig op de duploplaten (NEN 6265) of het aantal kolonies aanwezig op de selectieve plaat (ISO 11731) met het hoogste rendement (wel rekening houdend met een waarde uit zuurbehandeling wegens verdunning 1:1; dus x 2)
- f is de fractie van het aantal onderzochte kolonies waarvan is aangetoond dat het *Legionella* betreft
- V<sub>c</sub> is het volume van het concentraat in ml
- V<sub>p</sub> is het volume van het concentraat of ongefilterd monster dat per plaat geënt is, in ml
- V<sub>m</sub> is het volume van het onderzocht monster, in liter

#### NEN 6265

Indien geen *Legionellabacteriën* aangetoond zijn in 1 liter monster wordt het resultaat uitgedrukt als:

*Aantal Legionella* <25 kve/liter (daar er 2 x 100µl op 5ml is uitgeplaat en geteld indien een volume van 1000ml monster werd gefiltreerd).

*Aantal Legionella* <50 kve/liter (daar er 2 x 100µl op 5ml is uitgeplaat en geteld indien een volume van 500ml werd gefiltreerd).

*Aantal Legionella* <100 kve/liter (daar er 2 x 100µl op 5ml is uitgeplaat en geteld indien een volume van 250ml werd gefiltreerd).

*Aantal Legionella* <100 kve/liter (daar er 5 x 200µl op 5ml is uitgeplaat en geteld indien een volume van 50ml werd gefiltreerd).

#### ISO 11731

Indien geen *Legionellabacteriën* aangetoond zijn in 1 liter monster wordt het resultaat uitgedrukt als:

Aantal Legionella <50 kve/liter (daar er 1 x 100µl op 5ml is uitgeplaat en geteld indien een volume van 1000ml monster werd gefiltreerd).

Aantal Legionella <100 kve/liter (daar er 1 x 100µl op 5ml is uitgeplaat en geteld indien een volume van 500ml werd gefiltreerd).

## 8.2 ISO 11731-2 voor lage bacterieaantallen

Voor monsters na concentratie via filtratie en filter op de plaat

Het aantal bevestigde kve Legionella aanwezig op een selectieve plaat wordt uitgedrukt per gefiltreerd volume water of vermenigvuldigd met de nodige factor om een resultaat per liter te verkrijgen.

Indien geen Legionellabacteriën aangetoond zijn in het monster wordt het resultaat uitgedrukt als Legionella niet gedetecteerd / volume water.

### Rapport

Vermelding in het rapport van:

- het resultaat
- het volume van het in behandeling genomen monster
- de verwijzing van de gebruikte methode
- de monsteromschrijving en gegevens van het monsternamingsformulier
- de gemeten temperatuur bij monsternamings
- de monsternemer
- bijzondere opmerkingen

## 9 REFERENTIES

- NPR 6569 (1992) Bacteriologisch onderzoek van water – Toelichting bij monsterneming en conservering volgens NEN 6559.
- NEN 6559 (1992) Bacteriologisch onderzoek van water – Monsterneming en conservering.
- ISO 5667-2 (1991) Water quality – sampling – Part 2: Guidance on sampling techniques.
- ISO 19458 (2006) Water quality – sampling – General guide for sampling, transport, preservation and handling of samples for microbiological analysis.
- NEN 6265 (2007) Water – Detectie en telling van Legionella.
- NEN 6265/Ontw.A1 (2002) Bacteriologisch onderzoek van water – Onderzoek naar de aanwezigheid en het aantal kolonievormende eenheden KVE van Legionella -bacteriën.
- NPR 6266 (1991) Bacteriologisch onderzoek van water – Toelichting bij het onderzoek naar de aanwezigheid en het aantal kolonievormende eenheden KVE van Legionellabacteriën volgens NEN 6265
- ISO 11731 (1998) Water quality – Detection and enumeration of Legionella
- ISO 11731-2 (2004) Water quality – Detection and enumeration of Legionella Part 2: Direct membrane filtration method for waters with low bacterial counts.
- NF T 90-431 (septembre 2003) Qualité de l'eau - Recherche et dénombrement des Legionella spp et Legionella pneumophila. Méthode par ensemencement direct et après concentration par filtration sur membrane ou centrifugation.



- PR NF T90-431/A1 (Juin 2005) 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.
- ISO 8199 (2005) Water quality - General guidance to the enumeration of micro-organisms by culture.