

Bepaling van Legionella species en Legionella pneumophila

INHOUD

1	TOEPASSINGSGEBIED	4
2	PRINCIPE	4
3	OPMERKINGEN	5
4	APPARATUUR EN MATERIAAL	6
4.1	<i>Apparatuur</i>	6
4.2	<i>Materiaal</i>	6
5	REAGENTIA EN BEREIDINGEN	6
5.1	<i>Reagentia</i>	6
6	PROCEDURE	7
6.1	<i>Monstervoorbereiding</i>	7
6.2	<i>NEN 6265 methode</i>	7
6.2.1	Isolatie uit een watermonster met een hoge concentratie Legionella	7
6.2.2	Isolatie van Legionella uit een watermonster met veel of weinig storende flora	7
6.2.3	Aflezen van de platen	8
6.2.4	Bevestiging van presumptieve Legionellakolonies	8
6.3	<i>ISO 11731 methode</i>	8
6.3.1	Rechtstreeks uitplating	8
6.3.2	Membraanfiltratie	8
6.3.3	Isolatie	8
6.3.4	Behandelingen	9
6.3.5	Interpretatie en telling	9
6.3.6	Bevestiging van presumptieve Legionella kolonies	9
6.4	<i>Specifieke methode volgens ISO 11731-2 (lage bacterie tellingen)</i>	10
6.4.1	Membraanfiltratie	10
6.4.2	Interpretatie	10
6.4.3	Bevestiging van presumptieve Legionella kolonies	10
6.5	<i>Microbiologische identificatie van Legionella door middel van MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry)</i>	10
6.6	<i>Serologische bevestiging</i>	10
7	REAL-TIME PCR-DETECTIE EN KWANTIFICATIE VAN LEGIONELLA PNEUMOPHILA IN DRINKWATER VOOR SCREENING	11
7.1	<i>Principe</i>	11
7.2	<i>Performantiekarakteristieken kwalitatieve real-time PCR en kwantitatieve real-time PCR (qPCR)</i>	11
7.3	<i>Screening</i>	12
8	KWALITEITSCONTROLE	12

9	RAPPORTERING	13
9.1	<i>NEN 6265 en ISO 11731 methode</i>	13
9.2	<i>ISO 11731-2 voor lage bacterieaantallen</i>	14
10	REFERENTIES	14

1 TOEPASSINGSGBIED

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 analysemethoden 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 leidingwater): 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 agglutinatie of immunochromatografische test voor *Legionella pneumophila* serotype 1 en 2-14 (2-15¹) en *Legionella species* (verschillend van *pneumophila*)².

Voor de analyse koeltorenwaters is de parameter *Legionella spp* vastgelegd. Hier dient het totaal aantal pathogene en niet-pathogene *Legionella species* gerapporteerd te worden.

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 *Legionella*bacteriën verwacht worden, kan het monster ook rechtstreeks uitgeplaat

¹ Afhankelijk van de producent van de agglutinatie of immunochromatografische test

² *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.

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 monster worden geïnoculeerd op een vaste, selectieve voedingsbodem 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* agglutinatief / **immuno**chromatografische test.

- 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

Voor de conservering en behandeling van watermonsters wordt verwezen naar WAC/I/A/010.

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% Umonium³⁸ (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 Filtratietoestel met pomp
- 4.1.10 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 Stereomicroscop

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 Umonium³⁸ $2,5\%$ (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 agglutinatie of immunochromatografische test
- 5.1.12 Legionella pneumophila referentiebacterie

6 PROCEDURE

6.1 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.

6.2 NEN 6265 METHODE

6.2.1 ISOLATIE UIT EEN WATERMONSTER MET EEN HOGE CONCENTRATIE LEGIONELLA

Van een watermonster dat vermoedelijk een hoge concentratie aan *Legionella* bevat worden rechtstreekse uitplatingen 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 ± 2 min in het waterbad van 50°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).

6.2.2 ISOLATIE VAN LEGIONELLA UIT EEN WATERMONSTER MET VEEL OF WEINIG STORENDE FLORA

6.2.2.1 MEMBRAANFILTRATIE

De membraanfiltratie wordt uitgevoerd met een filtratietoestel met pomp (4.1.9). 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.

6.2.2.2 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 gevortext (4.1.5) of 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 ± 2 min in het waterbad van 50°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 (5.1.9)) 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 ± 2 min in een waterbad van 50°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).

6.2.3 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.

6.2.4 BEVESTIGING VAN PRESUMPTIEVE LEGIONELLAKOLONIES

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

Indien met deze 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 agglutinatie of immunochromatografische test (zie 6.6 serologische bevestiging).

6.3 ISO 11731 METHODE

6.3.1 RECHTSTREEKS UITPLATING

Van een monster dat vermoedelijk een heel hoog aantal *Legionella* bevat worden eerst rechtstreekse uitplantingen 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 GVPC plaat (5.1.9). 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).

6.3.2 MEMBRAANFILTRATIE

De membraanfiltratie wordt uitgevoerd met een filtratietoestel met pomp (4.1.9). De steriele filtratiekokers worden of zijn voorzien van steriele 0,2 of $0,45\mu\text{m}$ nylon of polycarbonaat membraanfilters (4.2.5). Filtratie van 1000/500 ml monster.

6.3.3 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 pereels.

Het flesje wordt gedurende 2 minuten gevortex (4.1.5) of in een ultrasoonbad (4.1.6) gebracht om de bacteriën van de filter te lossen.

6.3.4 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 ± 2 minuten in een waterbad van 50°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 GVPC plaat (5.1.9).

b) zuurbehandeld

Na grondig schudden wordt 0,5 ml portie gepipetteerd (4.2.9) in een steriel buisje (4.2.7). Hieraan wordt $500\mu\text{l}$ 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 GVPC plaat (5.1.9).

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 GVPC plaat (5.1.9).

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

6.3.5 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 ± 20 nm) autofluoresceren bepaalde *Legionella species*. *Legionella pneumophila* daarentegen autofluoresceert niet.

De verschillende types presumptieve *Legionellakolonies* worden verder bevestigd.

Hiervoor 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.

6.3.6 BEVESTIGING VAN PRESUMPTIEVE LEGIONELLA KOLONIES

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

Indien met deze 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 agglutinatie of **immunochromatografische** test (zie 6.6 serologische bevestiging).

6.4 SPECIEKE METHODE VOLGENS ISO 11731-2 (LAGE BACTERIE TELLINGEN)

6.4.1 MEMBRAANFILTRATIE

De membraanfiltratie wordt uitgevoerd met een filtratietoestel met pomp (4.1.9). De steriele filtratiekokers worden voorzien van steriele 0,45µm 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±5ml (4.2.10, 4.1.10) 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±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 luchtbelletjes tussen filter en agar voorkomen.

De platen worden ingepakt in plastic zakjes of dozen om uitdroging te vermijden, of geïncubeerd in een incubator met een vochtigheidscontrolesysteem. Incubatie van de petriplaten gedurende 10 dagen bij 36 ± 2°C (4.1.2).

6.4.2 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.

6.4.3 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 ± 2°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 agglutinatie of immunochromatografische test (zie 6.6).

6.5 MICROBIOLOGISCHE IDENTIFICATIE VAN LEGIONELLA DOOR MIDDEL VAN MALDI-TOF MS (MATRIX-ASSISTED LASER DESORPTION-IONIZATION TIME-OF-FLIGHT MASS SPECTROMETRY)

Voor de identificatie van *Legionella* kan gebruik gemaakt worden van de MALDI-TOF MS technologie. Hiervoor dient wel een verificatie uitgevoerd te worden conform ISO 16140.

6.6 SEROLOGISCHE BEVESTIGING

Voor de serotypering worden op minstens drie presumptieve *Legionella* bacteriën van eenzelfde soort een *Legionella* agglutinatie / immunochromatografische test (5.1.11) uitgevoerd. De test voor *Legionella* wordt uitgevoerd volgens de procedure op de bijsluiter.

Voor de agglutinatie test gaan antilichaampartikels agglutineren in aanwezigheid van specifieke *Legionella* celwandantigenen waarbij duidelijke zichtbare precipitaten worden gevormd.

Voor serotypering met de immunochromatografische test voor de kwalitatieve detectie van *Legionella* wordt een immunoassay uitgevoerd.

Een 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 REAL-TIME PCR-DETECTIE EN KWANTIFICATIE VAN LEGIONELLA PNEUMOPHILA IN DRINKWATER VOOR SCREENING

7.1 PRINCIPE

De aanwezigheid van *Legionella pneumophila* in een watermonster wordt aangetoond door real-time PCR uit te voeren volgens de referentiemethode ISO/TS 12869. Een watermonster wordt eerst gefiltreerd, het DNA vanop de filter wordt geëxtraheerd en opgezuiverd met een purificatiekit. Dit DNA-extract wordt gebruikt voor een specifieke amplificatie van een DNA-sequentie dat codeert voor het virulentiegen mip.

Het al dan niet optreden van een PCR signaal wijst op de aan- of afwezigheid van *Legionella pneumophila* in het watermonster.

Bij real-time PCR gaat tijdens amplificatiecycli een fluorescent gelabelde probe specifiek voor de geamplificeerde sequentie gaan hybridiseren met het amplicon. Deze probe geeft enkel een fluorescerend signaal vrij in gebonden toestand met zijn target sequentie, zoniet wordt het fluorescerend signaal gequencht (geabsorbeerd). De intensiteit van het fluorescerend signaal stijgt tijdens de PCR-reactie volgens de hoeveelheid van het amplicon in het monster. Deze fluorescentie wordt gedetecteerd door de optische unit van een geschikte real-time PCR toestel met fluorofoor specifieke filters en wordt met behulp van software weergegeven als een duidelijk te interpreteren resultaat.

Het al dan niet optreden van een fluorescerend signaal wijst op de aan- of afwezigheid van *Legionella pneumophila* in het watermonster.

Bij de kwantitatieve real-time PCR wordt een kalibratiecurve gemaakt met een standaardreeks DNA, en kan het target DNA gekwantificeerd worden.

Een volledige validatie dient aan te tonen dat deze alternatieve microbiologische methode geschikt is voor detectie van *Legionella pneumophila* in drinkwater (ISO 16140).

Maar voor implementatie is het aangewezen om een real-time PCR toestel samen met een commerciële kit bestemd voor real-time PCR-detectie en voor de DNA-extractie te gebruiken die reeds gevalideerd is door een derde partij. Dan dient voor ingebruikname geen diepgaande validatie meer uitgevoerd te worden, maar slechts een verificatie, zoals aangegeven in ISO/TS 12869 en NF T90-471.

7.2 PERFORMANTIEKARAKTERISTIEKEN KWALITATIEVE REAL-TIME PCR EN KWANTITATIEVE REAL-TIME PCR (qPCR)

Voor de kwalitatieve real-time PCR verificatie dient concreet volgende criteria nagezien te worden:

- Positieve en negatieve controles
- Robuustheid van de methode, op steriele watermonsters en op een complexe matrix
- Deelname aan een interlaboratorium ringtest

Voor de qPCR verificatie dient concreet volgende criteria nagezien te worden:

- Evaluatie van de kalibratiecurve
- Verificatie van de kwantificatielimiet LQqPCR uit de validatieprocedure
- Verificatie van de detectielimiet LDqPCR
- Selectiviteit via inclusiviteit en exclusiviteit van vermelde stammen in de norm
- Robuustheid van de methode, op steriele watermonsters en op een complexe matrix
- Bepaling van het verband tussen qPCR (GU/l) en kweek (kve/l)
- Deelname aan een interlaboratorium ringtest

7.3 SCREENING

Het is de bedoeling om de real-time PCR-techniek in te zetten louter voor het screenen van watermonsters. Hiertoe wordt een 'dubbel' volume bemonsterd, en een standaard volume getest met real-time PCR. Van de monsters die positief zijn (voor kwalitatieve real-time PCR een positief signaal) (voor qPCR dus met een resultaat groter dan de kwantificatielimiet LQqPCR), wordt het standaardvolume water onderworpen aan de uitplaatmethode voor kwantificatie, en wordt het resultaat van deze methode gerapporteerd. Voor monsters waarbij het resultaat met real-time PCR melding maakt van partiële, totale inhibitie, of een ongeldig resultaat wordt overgegaan tot de uitplaatmethode.

Voor monsters die negatief uit de real-time PCR komen, stopt de analyse en wordt een negatief resultaat gerapporteerd (uitgedrukt als negatief voor *Legionella pneumophila* met de verwijzing naar de gebruikte methode, equivalent met een negatief resultaat met de uitplaatmethode).

Indien een installatie dient gescreend en bemonsterd te worden waarbij voor desinfectie een 'thermische warmteshockbehandeling' is uitgevoerd, dient de bemonstering minstens 24 uur na deze behandeling uitgevoerd te worden, daar er mogelijks nog aanwezige *Legionella* DNA fragmenten tijdens de PCR zouden kunnen interfereren.

8 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.

9 RAPPORTERING

Voor elke analysemethode worden de aantallen gerapporteerd:

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

9.1 NEN 6265 EN ISO 11731 METHODE

Voor rechtstreekse uitplatingen (van 100µl)

Indien de platen een telbaar (van 4 tot 200 kve) aantal bevestigde kve *Legionella* vertoont wordt het hoogste aantal vermenigvuldigd met 10⁴ per liter gerapporteerd

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

Aantal Legionella > 2.10⁶ 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:

$$C = (N * f * V_c) / (V_p * V_m)$$

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_c is het volume van het concentraat in ml
- V_p is het volume van het concentraat of ongefilterd monster dat per plaat geënt is, in ml
- V_m 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).

9.2 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 bvb. de betreffende WAC methode
- de monsteromschrijving en gegevens van het monsternamformulier
- de gemeten temperatuur bij monsternam
- de monsternemer
- bijzondere opmerkingen

10 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.
- WAC/I/A/010 Conservering en behandeling van watermonsters.
- ISO/TS 12869:2012 Water quality – Detection and qualification of Legionella spp. and/or Legionella pneumophila by concentration and genic amplification by quantitative polymerase chain reaction (qPCR)
- An international trial of quantitative PCR for monitoring Legionella in artificial water systems. J.V. Lee et al Journal of Applied Microbiology 110, 1032–1044 2011
- NF T90-471 Juin 2015 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)
- MALDI-TOF MS
<http://www.gene-quantification.de/qpcr-ngs-2013/posters/P036-qPCR-NGS-2013.pdf>