

Bepaling van Legionella species en Legionella pneumophila in drinkwater en bepaling van Legionella species in koeltorenwater

INHOUD

1	TOEPASSINGSGEBIED	3
2	PRINCIPE	3
3	OPMERKINGEN	4
4	APPARATUUR EN MATERIAAL	4
4.1	<i>Apparatuur</i>	4
4.2	<i>Materiaal</i>	5
5	REAGENTIA EN BEREIDINGEN	5
5.1	<i>Reagentia</i>	5
6	PROCEDURE	5
6.1	<i>Monstervoorbereiding</i>	5
6.2	<i>Watermonsters</i>	6
6.3	<i>Concentratie van watermonsters</i>	6
6.4	<i>Monster voorbehandeling</i>	8
6.5	<i>Kweek</i>	8
6.6	<i>bevestiging van presumptieve legionella kolonies op cultuurmedia: bcye agar en bcye-cys agar</i>	10
6.7	<i>Voor drinkwaters: bijkomende bevestiging via serotypering van presumptieve Legionella kolonies met een agglutinatie of immunochromatografische test</i>	11
6.8	<i>Identificatie van Legionella door middel van MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry)</i>	11
7	REAL-TIME PCR-DETECTIE EN KWANTIFICATIE VAN <i>LEGIONELLA PNEUMOPHILA</i> 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>	12
7.3	<i>Screening</i>	12
8	RAPPORTERING	13
9	Rapport	14
10	REFERENTIES	14

1 TOEPASSINGSGBIED

Deze procedure beschrijft methodes voor het aantonen en kwantificeren van *Legionella* in water conform ISO 11731: 2017. Deze procedure is van toepassing bij het bacteriologisch onderzoek van water, en is hier uitgewerkt voor drinkwater en koeltorenwater.

Afhankelijk van de oorsprong van het monster en het te verwachten aantal interfererende micro-organismen dient een keuze gemaakt te worden via een beslissingsmatrix conform de ISO 11731: 2017.

Aanvulling bij deze methode conform het *Legionella*-Besluit van februari 2007

Aanvullend aan de analyse voor drinkwater 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 agglutinatief of immunochromatografische test voor *Legionella pneumophila* serotype 1 en 2-14 (2-15¹) en *Legionella species* (verschillend van *pneumophila* of de zgn. non-*pneumophila*)².

Voor de analyse van koeltorenwaters is de parameter *Legionella spp* vastgelegd. Hier dient het totaal *Legionella spp* (= *Legionella pneumophila* + *Legionella non-pneumophila*)³ 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 achtergrondflora en andere matrixinvloeden is dit niet altijd het geval.

Niet alle *Legionella* soorten zijn kweekbaar. Daarom coveren de methodes die in dit document worden beschreven niet alle soorten *Legionella*.

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.

Op basis van de beslissingsmatrix van de ISO 11731, zie Tabel 1 wordt in vier stappen gewerkt.

In stap 1 wordt de watermatrix op basis van ervaring ingedeeld in watermatrix A, B of C met respectievelijk lage, hoge en extreme hoge concentratie interfererende micro-organismen.

In stap 2 wordt een keuze gemaakt tussen

- rechtstreekse uitplating van het watermonster
- rechtstreekse verdunning van het watermonster en uitplating
- cellulose-nitrat of-ester membraanfiltratie (poriëngrootte 0,2 of 0,45 µm) en filter op plaat (optioneel met warmte voorbehandeling)

¹ Afhankelijk van de producent van de agglutinatief 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.

³ <http://www.rivm.nl/bibliotheek/rapporten/210231005.pdf> zie tabel 1

- polycarbonaat of polyethersulfon membraanfiltratie (poriëngrootte 0,2 µm) gevolgd door een elutieprocedure met glasparels

In stap 3 worden, om de groei van de geconcentreerde non-target bacteriën te verminderen die kunnen interfereren met de recovery van de beoogde *Legionella* - porties van een watermonster, een membraanfilter of een concentraat na elutieprocedure van stap 2 gecombineerd of aangevuld met warmtebehandeling, zure behandeling of een combinatie van beide.

In stap 4 wordt er finaal gekozen met welke *Legionella*-platen BCYE, BCYE+AB of GVPC of MWY de selectie wordt uitgevoerd. De behandelde porties of het ongefilterd monster of de membraanfilter worden geïnoculeerd op een voedingsbodem om de *Legionella* bacteriën, na incubatie, als karakteristieke kolonies te herkennen. Ter bevestiging wordt groei van presumptieve kolonies getest op BCYE en BCYE-cys om voor de *Legionella* bacteriën hun L-cysteïne- en ijzerbehoefte aan te tonen. Voor drinkwaters wordt de serologische bevestiging uitgevoerd met behulp van een *Legionella* agglutinatief / immuno-chromatografische test. Voor koeltorenwaters wordt de serotypering enkel op aanvraag of bij speciale omstandigheden zoals uitbraakonderzoeken bepaald.

3 OPMERKINGEN

Voor de monsternamen van watermonsters wordt verwezen naar WAC/I/A/001, WAC/I/A/002, WAC/I/A/003. Voor de conservering en behandeling van watermonsters wordt verwezen naar WAC/I/A/010. Voor kwaliteitscontrole wordt verwezen naar WAC/VI/A/003.

Legionella bacteriën zijn pathogene klasse II 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 (type FFP3) gedragen.

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

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

Elk werkoppervlak wordt voor en na gebruik ontsmet met 2,5% Umonium³⁸ (5.1.2) en nadien met 70% gedenatureerde ethanol (5.1.3).

Vóór het inoculeren 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 ± 3°C
- 4.1.2 Incubator 36 ± 2°C
- 4.1.3 Waterbad 50 ± 1°C
- 4.1.4 Schudtoestel
- 4.1.5 Vortex

- 4.1.6 Ultrasoon waterbad
- 4.1.7 Kolonietelapparaat
- 4.1.8 Veiligheidskabinet
- 4.1.9 Filtratietoestel met pomp
- 4.1.10 Herlaadbare pipette controller

4.2 MATERIAAL

- 4.2.1 Pincet
- 4.2.2 Steriele cellulosenitraat of cellulose-ester membraanfilter 0,2 of 0,45 µm
- 4.2.3 Steriele polycarbonaat of polyethersulfon membraanfilter 0,2 µm
- 4.2.4 Steriele (centrifuge) buisjes
- 4.2.5 Steriele flesjes met brede hals en een bodemlaag (±10g) glaspereels diameter 3 mm
- 4.2.6 Instelbare pipetten en steriele tips met filter
- 4.2.7 Wegwerppipetten
- 4.2.8 Entnaald met Pt-öse
- 4.2.9 Drigalski spatel
- 4.2.10 Stereomicroscoop
- 4.2.11 UV lamp

5 REAGENTIA EN BEREIDINGEN

5.1 REAGENTIA

- 5.1.1 Ringer 1/40 oplossing of gelijkwaardig diluent - zie ISO 11731: 2017 Bijlage C
- 5.1.2 Umonium³⁸ 2,5% (of gelijkwaardig biocide)
- 5.1.3 Gedenatureerde ethanol 70% (of gelijkwaardig)
- 5.1.4 *Legionella* BCYE + L-cysteïne (BCYE)
- 5.1.5 *Legionella* BCYE + antibiotica (BCYE+AB)
- 5.1.6 *Legionella* platen type MWY
- 5.1.7 *Legionella* platen type GVPC
- 5.1.8 *Legionella* BCYE zonder L-cysteïne (BCYE-cys) (of bloed agar / nutriënt agar / TSA)
- 5.1.9 *Legionella* zure buffer - zie ISO 11731: 2017 Bijlage D
- 5.1.10 *Legionella* agglutinatie of immunochromatografische test
- 5.1.11 *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 WATERMONSTERS

Door het complexe karakter van verschillende watermatrices bepaalt het laboratorium de geschikte methode voor elk monstertype. Met de beslissingsmatrix weergegeven in Tabel 1 bepaalt het laboratorium welke geschikte methode zal worden gevolgd.

Om de detectie van *Legionella* uit watermonsters te waarborgen, zal in de meeste gevallen een concentratietechniek door membraanfiltratie (zie 6.3.2 en 6.3.3) nodig zijn. Waar de concentratie *Legionella* naar verwachting groter is dan 10^4 kve/l (kolonievormende eenheden/liter), kan rechtstreekse uitplating van het ongeconcentreerde monster ook worden uitgevoerd. Een sterk verontreinigde monster wordt verdund met een diluent (5.1.1) aan de hand van wegwerppipetten (4.2.7) en direct uitgeplaat voor en na de voorbehandelingen (zie 6.4). De volumes van verdunde of verwerkte watermonsters worden genoteerd alsook welke voorbehandeling(en) er zijn uitgevoerd. Wanneer het aantal *Legionella* in een bepaald monster niet bekend is, worden prioritair de membraanfiltratietechnieken uitgevoerd. Volg daarom de procedure beschreven in 6.3.2 of 6.3.3. Rechtstreekse uitplating mag enkel gerapporteerd worden indien de membraanfiltratietechnieken geen bruikbaar resultaat genereert.

6.3 CONCENTRATIE VAN WATERMONSTERS

6.3.1 Algemeen

Voor een algemene omschrijving van de membraanfiltratietechniek, zie ISO 8199.

6.3.2 Membraanfiltratie en directe plaatsing van het filtermembraan op agarmedium

Filtreer (4.1.9) het watermonster (zonder behandeling, na zure behandeling en indien vereist na warmtebehandeling) via een 0,2 of 0,45 μm cellulosenitrat of cellulose-esters membraanfilter (4.2.2). De zure behandeling kan ook direct op de membraanfilter in de trechter worden gedaan (zie 6.4.2). Het gefiltreerd volume is afhankelijk van het deeltjesgehalte van het water of van het gewenste detectieniveau. Het gefiltreerd volume van het monster wordt geregistreerd. Verwijder voorzichtig de membraanfilter uit de filterhouder met een gedesinfecteerde pincet (4.2.1) en plaats deze rechtstreeks op de agarmedium, met aandacht dat er geen luchtballen onder gevangen zitten.

6.3.3 Membraanfiltratie en elutieprocedure met glasparels

Filtreer het watermonster door een 0,2 μm polycarbonaat of polyethersulfon membraanfilter (4.2.3). Het gefiltreerd volume is afhankelijk van het deeltjesgehalte van het water of het gewenste detectieniveau ⁴. Het gefiltreerde volume van het monster wordt geregistreerd. Verwijder de membraanfilter uit de filterhouder met een gedesinfecteerde pincet (4.2.1). Plaats de membraanfilter rechtstreeks in een steriele flesje met schroefdop met steriele glasparels (4.2.5) waaraan 5 ml (tot 10 ml) steriel diluent (5.1.1) of monster toegevoegd is en schud krachtig met een vortex (4.1.5) gedurende tenminste 2 minuten om de micro-organismen van het membraanfilter te wassen. Als alternatief, plaats het flesje in een ultrasoon waterbad (4.1.6) gedurende een tijdsinterval dat gevalideerd is om het optimale recovery te bekomen. Zorg ervoor dat het niveau van het diluent dat het membraan dekt, onder het waterniveau in het ultrasoon waterbad ligt. Verdeel dit concentraat in drie porties. Gebruik een portie onbehandeld, een portie voor warmtebehandeling (zie 6.4.1) en een portie voor behandeling met zure oplossing (zie 6.4.2). Opmerking: een bijkomend membraanfiltratie kan worden uitgevoerd voor een rechtstreekse zure voorbehandeling op de membraanfilter in de filterhouder.

⁴ Mogelijks is er voor moeilijk te filtreren monsters meer dan één membraanfilter nodig.

Stap 1											
Watermatrix A ¹			Watermatrix B ¹			Watermatrix C ¹					
Watermonsters met lage concentratie interfererende micro-organismen (6.5.2 en 6.5.3) Bijvoorbeeld: drinkwater			Watermonsters met hoge concentratie interfererende micro-organismen (6.5.4) Bijvoorbeeld: koeltorenwater, proceswater			Watermonsters met extreem hoge concentratie interfererende micro-organismen (6.5.5) Bijvoorbeeld: afvalwater, oppervlaktewater, zwaar beladen koeltorenwater					
Stap 2			Stap 3			Stap 4					
			BCYE	BCYE + AB	MWY of GVPC ²	BCYE	BCYE + AB	MWY of GVPC ²	BCYE	BCYE + AB	MWY of GVPC ²
rechtstreekse uitplating (bij hoge concentratie Legionella spp. > 10 ⁴ kve/L)	zonder behandeling		x	x							
	warmte behandeling							x			
	zure behandeling										x
cellulose-nitrat of-ester membraanfiltratie 0,2 of 0,45 µm en filter op plaat (optioneel met warmte voorbehandeling)	zonder behandeling		x								
	zure behandeling					x (BCYE+AB of MWY of GVPC ²)					
polycarbonaat of polyethersulfon membraanfiltratie 0,2 µm en elutieprocedure met glaspaprels	zonder behandeling		x			x (BCYE+AB of MWY of GVPC ²)					
	warmte behandeling		x			x (BCYE+AB of MWY of GVPC ²)					x
	zure behandeling		x			x (BCYE+AB of MWY of GVPC ²)					x
rechtstreekse verdunning en uitplating	zonder behandeling										x
	warmte behandeling										x
	zure behandeling										x
rechtstreekse uitplating											x
rechtstreekse verdunning en uitplating											x

¹ dit onderscheid in matrices kan op basis van ervaring van het laboratorium gewijzigd worden, waardoor een of meerdere bijkomende behandelingen worden uitgevoerd.

² minstens één selectieve plaat of meerdere van deze selectieve platen

Tabel 1 overzichtstabel ISO 11731 2017: beslissingsmatrix

6.4 MONSTER VOORBEHANDELING

6.4.1 Warmte behandeling

Breng het geconcentreerd of ongeconcentreerd watermonster in een steriele recipiënt en plaats deze in een waterbad (4.1.3) bij $(50\pm 1)^{\circ}\text{C}$ gedurende (30 ± 2) min. Kleine volumes (≤ 5 ml) dienen te worden gebruikt om een korte periode te borgen om de gewenste temperatuur te bereiken. Indien veel monsters samen worden behandeld of grote monsters worden behandeld of dikwandige recipiënten worden gebruikt, controleer de temperatuur in een aparte recipiënt dat vergelijkbaar is met die van het monster. De tijd begint te lopen wanneer de gewenste temperatuur bereikt is. Grote monstervolumes of dikwandige containers moeten afgekoeld worden om oververhitting te vermijden nadat ze uit het waterbad zijn verwijderd.

6.4.2 Zure behandeling

Verdun 1 volume van het geconcentreerd of ongeconcentreerd monster met negen volumes van de zure buffer (5.1.9), meng goed en laat inwerken gedurende $(5,0\pm 0,5)$ min. Als het verdund en met zuur behandelde monster wordt gebruikt voor de berekening van de finale concentratie van *Legionella* in het monster, moet de verdunning in rekening worden gebracht. Volumes groter dan 0,1 ml kunnen worden uitgeplaat om de detectiegrens te verlagen.

Zure behandeling kan na membraanfiltratie ook rechtstreeks op het membraanfilter in de filterhouder worden gedaan. Breng ongeveer 30 ml zure buffer (5.1.9) over op de membraanfilter, en laat het gedurende $(5\pm 0,5)$ min inwerken. Verwijder de zuuroplossing door filtratie. Was de membraanfilter met minstens 20 ml diluent (5.1.1). Het is belangrijk dat het diluent het oppervlak van de filterhouder niet spoelt welke niet in contact was met de zure oplossing.

6.5 KWEEK

6.5.1 Algemeen

De keuze van de methode die wordt gebruikt voor de telling van *Legionella* hangt af van de oorsprong / kenmerken van het monster en de reden van bemonstering of onderzoek. Er wordt een assumptie van de verwachte concentratie van interfererende micro-organismen gemaakt op basis van ervaring of oorsprong van het monster. Ook dient de gewenste ondergrens van het detectieniveau in beschouwing genomen worden. De beslissingsmatrix van Tabel 1 voor het kiezen van een geschikte methode wordt verder in detail beschreven in bijlage J van ISO 11731 2017. Afhankelijk van het gewenste detectieniveau is het mogelijk om meer dan één plaat van de verschillende cultuurmedia te gebruiken.

6.5.2 Watermonsters met een hoge concentratie *Legionella* species en een lage concentratie interfererende micro-organismen

Plaat het watermonster rechtstreeks uit als het aantal *Legionella* naar verwachting hoger is dan 10^4 kve/l. Spatel (4.2.9) en inoculeer telkens 0,1 ml van het monster op één BCYE-agar plaat (5.1.4) en één BCYE + AB-agar plaat (zie 5.1.5).

6.5.3 Watermonsters met een lage concentratie *Legionella* en een lage concentratie interfererende micro-organismen

a) Rechtstreekse plaatsing van membraanfilter op agarmedium na membraanfiltratie

Filter het monster (zie 6.3.2.) en plaats de onbehandelde membraanfilter rechtstreeks op één plaat BCYE-agar (5.1.4). De membraanfilters behandeld met een zuuroplossing volgens 6.4.2 worden geplaatst op één of meer selectieve of zeer selectieve platen van BCYE + AB-agar (5.1.5) of MWY-agar (5.1.6) of GVPC-agar (5.1.7).

b) Uitplating na membraanfiltratie en elutieprocedure met glasparels

Spatel (4.2.9) en inoculeer 0,1 ml van elk geconcentreerd deel van het monster (onbehandeld, warmte behandeld en zuur behandeld) van de membraanfiltratie met elutieprocedure (zie 6.3.3) op één plaat BCYE-agar (5.1.4) en op één of meer selectieve of zeer selectieve platen van BCYE + AB-agar (5.1.5) of MWY-agar (5.1.6) of GVPC-agar (5.1.7).

6.5.4 Watermonsters met hoge concentratie interfererende micro-organismen

Gebruik watermonsters met een hoge concentratie van interfererende micro-organismen ongeconcentreerd (voor rechtstreekse uitplating), geconcentreerd (zie 6.3.3) of verdund (1:10). Verdeel elke submonster in drie porties. Gebruik een portie onbehandeld, het tweede gedeelte voor warmte behandeling (6.4.1) en het derde gedeelte voor behandeling met zure oplossing (6.4.2). Spatel (4.2.9) en inoculeer 0,1 ml van elk gedeelte van de submonsters op één plaat MWY-agar (5.1.6) of op één plaat GVPC-agar (5.1.7).

6.5.5 Watermonsters met extreme hoge concentratie interfererende micro-organismen

Gebruik watermonsters met een extreem hoge concentratie aan interfererende micro-organismen na een voorbehandeling van een combinatie van warmte en zuur. Voor deze gecombineerde behandeling wordt eerst de warmtebehandeling (zie 6.4.1) gedaan, gevolgd door de zure behandeling (zie 6.4.2) waardoor de verdunning 1:10 wordt bekomen. Eventueel wordt deze fractie na de dubbele behandeling nog eens extra verdund (= finaal 1:100) in steriel diluent (5.1.1). Het is belangrijk om het warmte behandelde monster af te koelen tot kamertemperatuur voordat de zure behandeling wordt uitgevoerd.

Meng goed met behulp van een vortex (4.1.5) of een ultrasoon waterbad (4.1.6). Voeg eventueel een laag steriele glasparels (net genoeg om de bodem van het recipiënt te bedekken) aan het oorspronkelijk monster toe om het desaggregatie van het materiaal te bevorderen. Spatel (4.2.9) en inoculeer 0,1 ml van elk portie op één plaat MWY-agar (5.1.6) of op één plaat GVPC-agar (5.1.7).

6.5.6 Incubatie

Laat de geïnoculeerde platen staan totdat het geïnoculeerde volume is geabsorbeerd, draai de platen om en incubeer ze bij (36±2)°C (4.1.2) gedurende 7 tot 10 d. Maak een vochtige atmosfeer om uitdroging van de platen te voorkomen, bijvoorbeeld door ze in te pakken in plastic zakjes of dozen, of door te incuberen in een incubator met een vochtigheid-controlesysteem.

Opmerking: validatiegegevens met behulp van gespikte monsters hebben geen verschil in tellingen tussen 7 d en 10 d incubatie aangetoond. Natuurlijke monsters met wilde *Legionella* stammen kunnen echter de volledige incubatietijd van 10 d nodig hebben om de groei te bekomen.

6.5.7 Aflezen van de platen

Controleer de platen voor het eerst op dag 3, 4 of 5, gevolgd door een finale controle aan het einde van de incubatieperiode, dit ter identificatie van monsters waar overgroeï zich voordoet. Het uiteindelijke kwantitatieve resultaat is enkel beschikbaar aan het einde van de incubatieperiode (6.5.6). Aangezien *Legionella* langzaam groeit en kan worden gemaskeerd door de groei van andere micro-organismen, worden platen bij voorkeur beoordeeld met een stereomicroscop (4.2.10) met schuine invalverlichting. Noteer het aantal van elk type presumptieve aanwezige *Legionella*.

Bij onderzoek van *Legionella* uitbraken is het raadzaam om monsters die naar verwachting een hoge concentratie interfererende micro-organismen hebben om de platen op dag 3 te controleren om te bepalen of verdunningen nodig zijn. Wees bewust van de mogelijke negatieve effecten van het behoud van het concentraat of watermonster gedurende een periode van twee extra dagen.

Legionella kolonies zijn in het algemeen witgrijs maar kunnen ook in andere kleuren verschijnen. Ze hebben een karakteristieke morfologie: kolonies een gave rand en vertonen een typische matglazen uitstraling⁵. Onder een ultraviolet lamp (4.2.11), autofluoresceren verschillende soorten *Legionella* kolonies als briljant wit (*L. anisa*, *L. bozemanii*, *L. cherrii*, *L. dumoffii*, *L. gormanii*, *L. gratiana*, *L. parisiensis*, *L. steigerwaltii* en *L. tucsonensis*); *L. erythra* en *L. rubrilucens* lijken rood. Kolonies *L. pneumophila* lijken dof groen, vaak met gele tinten, en autofluoresceren niet. De kleur van de fluorescentie kan bijdragen tot het differentiëren van kolonies in monsters die verschillende soorten *Legionella* bevatten. Om te vermijden dat *Legionella* kolonies kunnen worden of beschadigd of afgedood zodat ze niet verder kunnen worden gekweekt, mogen platen niet lang aan ultraviolet licht blootgesteld worden dan nodig is. Er dient opgemerkt te worden dat nieuwe soorten *Legionella* andere eigenschappen kunnen bezitten dan deze hierboven beschreven.

6.6 BEVESTIGING VAN PRESUMPTIEVE LEGIONELLA KOLONIES OP CULTUURMEDIA: BCYE AGAR EN BCYE-CYS AGAR

In de loop van de incubatie van de platen die onder 6.5.6 wordt uitgevoerd wordt er een bevestigingstest gedaan vertrekkend van de plaat(en) met de meest representatieve presumptieve *Legionella* kolonies (zie 6.5.7). Als er slechts één kolonietype waar te nemen is, kies dan minstens drie presumptieve kolonies. Indien er meer morfologische verschillende soorten presumptieve *Legionella* kolonies op de plaat groeien, dient men tenminste één kolonie van elk type nemen. *Legionella* kolonies behorende tot verschillend species en/of serotypes vertonen verschillen in morfologie of kleur, en worden ook na verschillende incubatietijden zichtbaar (*Legionella pneumophila* bijvoorbeeld is reeds zichtbaar na 3 dagen incubatie, bepaalde *Legionella species* worden pas na 5 dagen incubatie zichtbaar). Op die basis kunnen *Legionella* kolonies van verschillende types op eenzelfde of verschillende platen worden onderscheiden. Hiervoor worden de presumptieve *Legionella* bacteriën overgeënt met een entnaald met Pt-öse (4.2.8) op één BCYE plaat (5.1.4) en één BCYE-cys plaat of evenwaardig (5.1.8). Neem de nodige voorzorgen om geen cultuurmedium samen met de kolonie over te brengen en ent eerst een plaat van BCYE-cys agar plaat en pas daarna de BCYE-agar plaat.

De platen worden geïncubeerd gedurende 3 d tot 5 d bij $36 \pm 2^\circ\text{C}$ (4.1.2) tot er groei optreedt. *Legionella* vertoont groei op de BCYE en niet op de BCYE-cys. Noteer de resultaten voor elke plaat. Als de aanvankelijke subculturen niet als *Legionella* bevestigen, analyseer dan verdere subculturen presumptieve *Legionella* kolonies uit een ander type plaatje (bvb van de monsterbehandelingen).

L. oakridgensis en *L. spiritensis* vereisen L-cysteïne en ijzer (III) voor de primaire isolatie, maar groeien daarna soms zwak in afwezigheid van toegevoegd L-cysteïne. Bijgevolg moet een zorgvuldige vergelijking gemaakt worden met de verschillen in groeimedia met of zonder toevoeging.

⁵ De kolonies *Legionella pneumophila* vertonen vaak een groenroze rand onder een steriomicroscop

Bij speciale omstandigheden zoals uitbraakonderzoeken, worden ten minste vijf presumptieve kolonies bevestigd indien er maar één morfologie aanwezig is, of twee presumptieve kolonies bevestigd voor elk type morfologie. (Indien identificatie van de *Legionella* kolonies moet worden uitgevoerd (zie ISO 11731: 2017 Bijlage G) en opgenomen in het testrapport, dienen alle typische morfologieën op een van de platen te worden bevestigd en worden de identificaties gemeld).

6.7 VOOR DRINKWATERS: BIJKOMENDE BEVESTIGING VIA SEROTYPERING VAN PRESUMPTIEVE *LEGIONELLA* KOLONIES MET EEN AGGLUTINATIE OF IMMUNOCHROMATOGRAFISCHE TEST

Voor drinkwaters worden de *Legionella* kolonies bijkomend via serotypering bevestigd met een agglutinatie of met een immunochromatografische test (5.1.8). Hiervoor worden op minstens drie presumptieve *Legionella* bacteriën van eenzelfde soort een test 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 (non- *pneumophila*).

Alle waarnemingen worden genoteerd.

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

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

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

7.1 PRINCIPE

De aanwezigheid van *Legionella pneumophila* in een drinkwatermonster 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 RAPPORTERING

Om het aantal kve *Legionella* in het oorspronkelijke watermonster te bepalen, selecteer de plaat of set platen (van hetzelfde groeimedium) met het maximale aantal bevestigde kolonies per watervolume. Houd rekening met de verdunning. Neem geen gemiddeld afkomstig van verschillende methoden, behandelingen of groeimedia, omdat deze geen replica's zijn.

Bereken het aantal kve/l *Legionella* in het oorspronkelijke monster (zie voorbeelden hieronder), conform ISO 8199, als volgt.

- ✓ Rechtstreeks uitplating

$$C_s = \frac{a}{V_{\text{tot}}} \times V_s$$

- ✓ Membraanfiltratie op plaat

$$C_s = \frac{a}{V_{\text{tot}}} \times V_s$$

- ✓ Membraanfiltratie met elutieprocedure (onrechtstreekse filtratie)

$$C_s = \frac{a \times V_c}{V \times V_{\text{tot}}} \times V_s$$

- ✓ Uitplating na verdunning

$$C_s = \frac{a \times V_s}{V_{\text{dil}}} \times Df$$

Waarbij:

C_s is het aantal *Legionella* in kve/l

a is het aantal berekende bevestigde *Legionella* kolonies

$$a = \frac{\text{fractie positief bevestigd}}{\text{fractie totaal bevestigd}} \times \text{totaal aantal}$$

V_c is het (geconcentreerde) monstervolume in ml

V is het monstervolume geïnoculeerd per plaat of set platen (van zelfde groeimedium) in ml

V_{tot} is het totale geanalyseerd monstervolume in ml

V_s is het gekozen referentievolume om de concentratie van de micro-organismen in het watermonster weer te geven (gewoonlijk 1 000 ml)

V_{dil} is het verdunde monstervolume geïnoculeerd per plaat of set platen (van hetzelfde groeimedium) in ml

D_f is de verdunningsfactor.

Het doel is het aantonen van het aantal bevestigde *Legionella* in een watermonster.

- Voor drinkwater worden de aantallen kve/l gerapporteerd:
 - Legionella pneumophila* serotype 1
 - Legionella pneumophila* serotype 2-14 (2-15)
 - Legionella* species (non- *pneumophila*)
- Voor koeltorenwater wordt het aantal kve/l gerapporteerd:
 - Legionella* spp.

Bij afwezigheid, wordt het resultaat uitgedrukt als "niet gedetecteerd" in het onderzochte volume en vermeld de detectiegrens berekend volgens de gebruikte procedure (zie ISO 11731: 2017 tabel J.1).

9 RAPPORT

Vermelding in het rapport van:

- het resultaat
- het volume van het in behandeling genomen watermonster
- de verwijzing van de gebruikte methode, minstens de betreffende WAC methode
- de monsteromschrijving en gegevens van het monsternamendocument
- de gemeten temperatuur bij monsternamendocument
- de monsternemer
- bijzondere opmerkingen

10 REFERENTIES

- ISO 11731 (2017) Water quality - Enumeration of *Legionella*
- ISO 8199 (2005) Water quality - General guidance to the enumeration of micro-organisms by culture.
- ISO 16140-1:2016 Microbiology of the food chain - Method validation - Part 1: Vocabulary
- ISO 16140-2:2016 Microbiology of the food chain - Method validation - Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method
- WAC/II/A/010 Conservering en behandeling van watermonsters
- WAC/VI/A/003 Kwaliteitseisen voor de analysemethoden
- 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>
 - http://www.afsca.be/laboratories/labinfo/ documents/2015-04 labinfo13-p12_en.pdf
- Pavlovic, Melanie, et al. "Application of MALDI-TOF MS for the identification of food borne bacteria." The open microbiology journal 7 (2013): 135.