

Het betreft hier een beperkte verificatie omdat de kwantitatieve real-time PCR voorlopig enkel kan ingezet worden voor screening doeleinden, gezien het niet eenduidig verband tussen qPCR (GU/l) en kweek (kve/l).

7.3 SCREENING

Het is de bedoeling om de real-time PCR-techniek in te zetten louter voor het screenen van watermonsters binnen een beheersplan. Hiertoe wordt een 'dubbel' volume bemonsterd⁵, 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).

Indien een installatie dient gescreend en bemonsterd te worden waarbij voor desinfectie een 'thermische shockbehandeling' 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.

Via de PCR-screening wordt enkel de wettelijke drinkwaterparameter *Legionella pneumophila* bepaald die beschouwd kan worden als indicatorparameter voor screening van installaties binnen een beheersplan.

Een negatief resultaat van de PCR-screening wordt uitgedrukt als "*Legionella pneumophila*: niet gedetecteerd" in het onderzochte volume.

8 SPECIEKE RICHTLIJNEN BIJ EEN KLINISCH BEVESTIGDE LEGIONELLOSE OF EEN UITBRAAK

8.1 AFLEZEN VAN DE PLATEN BIJ EEN KLINISCH BEVESTIGDE LEGIONELLOSE OF EEN UITBRAAK

Controleer de platen op dag 3, 4 of 5 zodat reeds overgegaan kan worden naar de bevestigingstest (zie 6.6). Na 3 tot 5 dagen incubatietijd van de bevestigingsplaten en uitvoeren van de serotypering (zie 6.7 en 6.8) dient dan aan het Agentschap Zorg en Gezondheid een indicatief *Legionella* resultaat doorgegeven te worden in het kader van verplichte melding bij vastgestelde Legionellose of een uitbraak.

De incubatie wordt dan verder gezet tot het einde van de volledige periode van 10±1 dagen waarna nogmaals de aflezing en bevestiging (bij bijkomende waargenomen verdachte groei) wordt uitgevoerd (zie 6.5.7, 6.6 en 6.7), en finaal opnieuw gerapporteerd aan het Agentschap Zorg en Gezondheid.

⁵ Zie WAC/I/A/001 of WAC/I/A/002

- indien er eerst een tussentijdse telling van gedetecteerde presumptieve (en na bevestiging aangetoonde) *Legionella* is uitgevoerd en in latere fase door overgroei van interfererende flora geen finaal *Legionella* resultaat kan bepaald worden, dient bij het resultaat van de tussentijdse telling een opmerking aangegeven te worden dat 'door overgroei van interfererende flora voor dit watermonster enkel een indicatief *Legionella spp.* resultaat kan gerapporteerd worden'.

Voor de rapportering in geval van PCR-screening gelden andere afspraken zie 7.

9.3 VOORBEELDEN

- Filtratie van drinkwater 1000 ml
 - op geen van de platen *Legionella pneumophila* serotype 1
 - hoogste aantal (na omrekening) *Legionella pneumophila* serotype 2-14(15): 40 kolonies na MF en warmte behandeling (elutie in 5 ml oplossing) op BCYE
 - hoogste aantal (na omrekening) *Legionella* species: 10 kolonies na MF en na zuur behandeling (elutie in 5 ml oplossing) op BCYE+AB

→ rapporteer < 50 *Legionella pneumophila* serotype 1
 2.10³ of 2.000 kve/L *Legionella pneumophila* serotype 2-14(15)
 5.10³ of 5.000 kve/L *Legionella* species (non- *pneumophila*)
- Filtratie van koeltorenwater 250 ml
 - hoogste aantal (na omrekening) *Legionella pneumophila* serotype 1: 40 kolonies op MF na warmte behandeling (elutie in 5 ml oplossing) op MWY
 - op geen van de platen *Legionella pneumophila* serotype 2-14(15)
 - hoogste aantal (na omrekening) *Legionella* species: 1 kolonie *Legionella* species op R na zuur behandeling op GVPC

→ rapporteer 8.10³ of 8.000 kve/L *Legionella pneumophila* serotype 1
 < 200 *Legionella pneumophila* serotype 2-14(15)
 1.10⁵ of 100.000 kve/L *Legionella* species (non- *pneumophila*)
 Totaal aantal *Legionella*: 1,08.10⁵ of 108.000 kve/l

9.4 MINIMALE INHOUD RAPPORT

Vermelding in het rapport:

- de resultaten
- 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 monsternamformulier
- de gemeten temperatuur bij monsternam
- de monsternemer
- bijzondere opmerkingen (bv. het gebruik van 0,45 µm filter voor watermatrix C bij de elutieprocedure)

10 REFERENTIES

- ISO 11731 (2017) Water quality - Enumeration of *Legionella*
- ISO 8199 (2018) 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/I/A/010 Conservering en behandeling van watermonsters
- WAC/VI/A/003 Kwaliteitseisen voor de analysemethoden
- ISO/TS 12869:2019 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.