

Bepaling van Legionella in drinkwater en afvalwater

INHOUD

1	TOEPASSINGSGBIED	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>Monsterhomogenisatie</i>	7
6.2	<i>Behandeling van watermonsters</i>	7
6.3	<i>Concentratie van watermonsters</i>	8
6.4	<i>Behandelingen</i>	9
6.5	<i>Kweek</i>	10
6.6	<i>bevestiging van presumptieve legionella kolonies op cultuurmedia bcye(+cys) en bcye-cys agar</i>	13
6.7	<i>bijkomende bevestiging via serotypering van presumptieve Legionella kolonies met een agglutinatie of immunoassay test</i>	14
6.8	<i>Identificatie van Legionella door middel van MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry)</i>	14
7	Specifieke richtlijnen voor analyse van afvalwater uit een waterzuiveringinstallatie/biologiebekken (WZI/BB)	15
7.1	<i>Principe</i>	15
7.2	<i>Kweek</i>	15
8	REAL-TIME PCR-DETECTIE EN KWANTIFICATIE VAN <i>LEGIONELLA PNEUMOPHILA</i> IN DRINKWATER VOOR SCREENING in kader van een beheersplan	16
8.1	<i>Principe</i>	16
8.2	<i>Performantiekarakteristieken kwalitatieve real-time PCR en kwantitatieve real-time PCR (qPCR)</i>	17
8.3	<i>Screening</i>	17
9	SPECIFIEKE RICHTLIJNEN BIJ EEN KLINISCH BEVESTIGDE LEGIONELLOSE OF EEN UITBRAAK	18
9.1	<i>Aflesen van de platen bij een klinisch bevestigde Legionellose of een uitbraak</i>	18
9.2	<i>Bevestiging van presumptieve Legionella kolonies</i>	18
9.3	<i>Screening met PCR</i>	18

10	RAPPORTERING	18
10.1	<i>Formules</i>	18
10.2	<i>Rapportering uit Legiolert</i>	19
10.3	<i>Afspraken met betrekking tot rapportering</i>	19
10.4	<i>Voorbeelden</i>	21
10.5	<i>Minimale inhoud rapport</i>	22
11	REFERENTIES	22

1 TOEPASSINGSGBIED

Deze procedure beschrijft methodes voor het aantonen en kwantificeren van *Legionella* in drinkwater en in afvalwater conform ISO 11731:2017. Sinds de versie van oktober 2019 wordt de scenariokeuze niet meer aan het laboratorium overgelaten. In de huidige versie is bijkomend de verplichte uitvoering van de rechtstreekse uitplating voor drinkwater opgenomen en werd de rapporteringswijze gewijzigd.

Deze procedure is van toepassing bij het bacteriologisch onderzoek van water, en is hier uitgewerkt voor drinkwater en afvalwater.

De door het Departement Omgeving toegekende erkenning voor *Legionella* analyses omvat twee deeldomeinen, nl. drinkwater (dw) en afvalwater (aw). Koeltorenwater wordt - onafhankelijk van het type water waarmee de koeltoren wordt gevoed - gecatalogeerd onder afvalwater.

Voor de analyse van drinkwatermonsters is watermatrix A van ISO 11731:2017 van toepassing.

Voor de in het Legionella Besluit onderverdeelde koeltorenwaters “Onderafdeling III Koeltorens die niet met oppervlaktewater werken”, “Onderafdeling I Koeltorens met natuurlijke trek die gebruikmaken van oppervlaktewater”, en “Onderafdeling II Koeltorens met geforceerde trek die gebruikmaken van oppervlaktewater” zijn watermatrix B en watermatrix C van ISO 11731:2017 van toepassing. De specifieke richtlijnen voor analyse van afvalwater uit een waterzuiveringinstallatie / biologiebekken van mestverwerkingsinstallaties (WZI/BB) zijn een afgeleide van de methode voor watermatrix C.

Aanvullend bij de bepaling van het Legionellagehalte in alle watermatrices dient een serologische typering te worden uitgevoerd. Dit betekent dat bij elk analyseresultaat een onderscheid dient gemaakt te worden tussen *Legionella pneumophila* serotype 1, *Legionella pneumophila* serotype 2-14 (2-15¹) en *Legionella species* (verschillend van *pneumophila* of de zgn. non-*pneumophila*)² aan de hand van een agglutinatie of immunochromatografische test.

Naast de procedure conform ISO 11731:2017 kan de alternatieve MPN-methode Legiolert gebruikt worden voor de bepaling van *Legionella pneumophila* in drinkwater. Voor de bepaling van *Legionella species* (non- *pneumophila*) dient bijkomend steeds de ISO 11731 aangewend worden.

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.

De beslissingsmatrix van de ISO 11731:2017, waarop deze procedure is gebaseerd, omvat vier stappen.

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 serotypes dan *L. pneumophila* en door andere *Legionella species* worden andere *Legionella species* in water ook als potentieel risico beschouwd (zie Table A.1 — *Legionella species associated with disease in ISO 11731:2017*).

In stap 1 worden watermatrices als volgt ingedeeld:

- watermatrix A: water met lage concentratie interfererende micro-organismen (drinkwater)
- watermatrix B: water met hoge concentratie aan interfererende micro-organismen (koeltorenwater)
- watermatrix C: water met extreem hoge concentratie aan interfererende micro-organismen (zwaar beladen koeltorenwater).

Stap 2 geeft het te volgen analysescenario aan:

- rechtstreekse uitplating van het watermonster
- polycarbonaat of polyethersulfon membraanfiltratie (poriëngrootte 0,2 µm of 0,45 µm) gevolgd door een elutieprocedure met glasporels
- 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)

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

In stap 4 wordt er aangegeven met welke *Legionella*-platen BCYE, BCYE+AB, GVPC of MWY de *Legionella* groei minimaal moet worden uitgevoerd. De behandelde porties (of een verdunning ervan) 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(+cys) en BCYE-cys om voor de *Legionella* bacteriën hun L-cysteïne- en ijzerbehoefte aan te tonen. Nadien wordt de serologische typering uitgevoerd met behulp van een *Legionella* agglutinatief / immunochromatografische test, om finaal een eindresultaat te rapporteren. De platen aangegeven in stap 4 zijn telkens het minimaal aantal te gebruiken platen. De keuze om bijkomende platen te gebruiken kan een meerwaarde zijn (duplo's, inzetten van extra verdunningen, gebruik van BCYE-cys bij stap 4, ...).

In deze versie van WAC/V/A/005 werden, omwille van de vergelijkbaarheid van *Legionella* resultaten tussen erkende laboratoria, slechts een aantal van de keuzemogelijkheden vanuit ISO 11731:2017 weerhouden en werden bepaalde stappen uitgebreid.

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.

Het laboratorium dient uitgerust te zijn met een microbiologische veiligheidswerkkast MVK (4.1.8) en een gevalideerde autoclaaf (4.1.1).

Elk werkoppervlak wordt voor en na gebruik ontsmet met een biocide naar keuze (5.1.2) of (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 MVK (4.1.8). 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 Microbiologische veiligheidswerkkast (MVK)
- 4.1.9 Filtratietoestel met pomp
- 4.1.10 Herlaadbare pipette controller
- 4.1.11 **Legiolert Quanti-tray + Idexx sealer + rubber frame**

4.2 MATERIAAL

- 4.2.1 Pincet
- 4.2.2 Steriele cellulosenitrat of cellulose-ester membraanfilter 0,2 of 0,45 µm
- 4.2.3 Steriele polycarbonaat of polyethersulfon membraanfilter 0,2 µm of 0,45 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) / BCYE(+cys)
- 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
- 5.1.12 **Legiolert reagens en supplement voor bepaling waterhardheid**

6 PROCEDURE

6.1 MONSTERHOMOGENISATIE

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 BEHANDELING VAN WATERMONSTERS

De door de erkende laboratoria te volgen analysescenario's worden weergegeven in onderstaand schema:

Drinkwater

Scenario A

Analyse via **R** (rechtstreekse uitplating) fractie O (onbehandeld) & **MF** (membraanfiltratie) + elutie, te filtreren volume minimaal 250 ml op 0,2 µm filter, desnoods 2 filters

Fracties

- O (onbehandeld)
- H (warmte behandeld)
- Z (zuur behandeld)

Uitzondering:

Analyse via **MF** en filter op plaat voor heel lage aantallen *Legionella* & lage concentratie interfererende micro-organismen (volume < 250ml aanvaardbaar)

Koeltorenwater

Scenario B

Analyse via **R &** via **MF** + elutie

Voor te filtreren volume streven naar 250 ml op 0,2 µm filter (criterium MF 15 minuten minimum 100 ml, zoniet scenario C)

Telkens fracties

- O
- H
- Z

Scenario C

Analyse via **R &** via **MF** + elutie

Filtratie heel moeilijk/niet mogelijk op 0,2 µm → gebruik 0,45 µm filter

Voor te filtreren volume streven naar 250 ml, desnoods 2 filters

Telkens fracties

- H
- Z
- H&Z

Om de detectie van *Legionella* uit **drinkwatermonsters** te waarborgen, dienen steeds én de concentratietechniek door membraanfiltratie gevolgd door elutieprocedure met glaspapels én de rechtstreekse uitplatingen uitgevoerd worden (zie verder 6.5.1).

In **twee** gevallen is er een uitzondering:

- Uit voorkennis kan voor drinkwatermonsters met heel lage concentratie *Legionella* en een lage concentratie interfererende micro-organismen de membraanfiltratie gevolgd door directe

plaatsing (6.3.2) van het filtermembraan op twee agarmedia (zie verder 6.5.2) toegepast worden (dit om een lage detectiegrens te bekomen). De methode directe plaatsing mag enkel toegepast worden op zwembadwater dat sterk gechloreerd is, of als een bijkomende methode naast de membraanfiltratie en elutie.

Wanneer het *Legionella* analyseresultaat na membraanfiltratie en directe plaatsing van filter op plaat een niet telbare waarde is, en er geen ander resultaat beschikbaar is, dient een nieuw watermonster aangevraagd en ingezet te worden.

- Voor de bepaling van *Legionella pneumophila* kan de werkwijze voor de MPN-methode Legiolert gebruikt worden. De test is gebaseerd op een bacteriële enzymdetectie-technologie die de aanwezigheid van *Legionella pneumophila* aangeeft, door gebruik te maken van een substraat in het Legiolert-reagens dat aan een enzyme van de bacterie bindt. Actief groeiende *Legionella pneumophila*-stammen gebruiken het toegevoegde substraat om een bruine kleurindicator te produceren. Elke verandering van de oorspronkelijke kleur naar bruin wordt beschouwd als een positief resultaat en wordt geteld.

Legiolert detecteert *Legionella pneumophila* in 100 ml (of per 50ml of 10ml) binnen 7 dagen.

Voor de bepaling volg het [Legiolert Quanti-tray®protocol](#). Raadpleeg de bijgeleverde MPN-tabel om het resultaat (meest waarschijnlijke aantal) te bepalen.

Voor de bepaling van *Legionella species*, volg de werkwijze in 6.3 voor watermatrix A.

Om de detectie van *Legionella* uit **koeltorenwatermonsters** te waarborgen, dienen steeds én de concentratietechniek door membraanfiltratie gevolgd door elutieprocedure met glasparels én de rechtstreekse uitplatingen uitgevoerd te worden (zie verder 6.5.3 en 6.5.4).

Het aantal in te zetten platen wordt voor elk scenario in de tabellen onder 6.5 aangegeven.

Afhankelijk van het gewenste detectieniveau is het mogelijk om meer dan één plaat van de verschillende cultuurmedia te gebruiken.

6.3 CONCENTRATIE VAN WATERMONSTERS

6.3.1 Algemeen

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

6.3.2 Membraanfiltratie en elutieprocedure met glasparels

Filtreer voor watermatrix A minstens 250 ml (preferentieel 500 ml/1000 ml) watermonster door een 0,2 µm polycarbonaat of polyethersulfon membraanfilter (4.2.3), desnoods door gebruik te maken van 2 filters voor moeilijk filtreerbare drinkwaters.

Tracht voor watermatrix B minstens 250 ml watermonster te filtreren door een 0,2 µm polycarbonaat of polyethersulfon membraanfilter (4.2.3). Bij een niet vlotte filtratie wordt deze gedurende 15 minuten aangehouden, waarna minstens een volume van 100 ml watermonster gefiltreerd moet zijn. Wanneer hieraan kan worden voldaan mag overgegaan worden tot elutie, zoniet dient de methode voor watermatrix C gevolgd te worden. Het afwijkend gefiltreerde volume van het monster wordt geregistreerd.

Voor filtratie van zwaarbeladen moeilijk filtreerbare waters nl. watermatrix C waarvan de filtratie van 250 ml op een 0,2 µm filter heel moeilijk of niet mogelijk is (door interfererende flora of door aanwezigheid van dispersanten) wordt een 0,45 µm polycarbonaat of polyethersulfon membraanfilter gebruikt. Desnoods worden 2 filters gebruikt voor de filtratie van 250 ml; in dit geval worden beide filters samen in één elutiepotje met parels geëluëerd. Wanneer in uitzonderlijk geval bij gebruik van twee filters het beoogde volume van 250 ml niet kan worden bereikt, mag overgegaan worden tot de elutie. Bij afwijking van het beoogd volume van 250 ml, wordt het gefiltreerde volume van het monster geregistreerd.

Verwijder de membraanfilter uit de filterhouder met een gedesinfecteerde pincet (4.2.1). Plaats de membraanfilter(s) met de residu-kant naar beneden in een steriele flesje met schroefdoop met steriele glasparsels (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 de membraanfilter te wassen. Als alternatief, plaats het flesje in een ultrasoon waterbad (4.1.6) gedurende een tijdsinterval dat gevalideerd is om 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 aansluitend dit concentraat in drie porties voor de behandelingen van stap 3.

Opmerking 1: in plaats van een behandeling met zuuroplossing op een portie van het concentraat kan een bijkomende membraanfiltratie worden uitgevoerd voor een rechtstreekse zuur voorbehandeling op de membraanfilter in de filterhouder (zie 6.4.2).

Opmerking 2: (Her)vortex elke portie net voor het uitplaten.

6.3.3 Membraanfiltratie en directe plaatsing van het filtermembraan op agarmedium

Filtreer (4.1.9) het drinkwatermonster (zonder behandeling, na zuur behandeling en optioneel na warmte behandeling) via een 0,2 of 0,45 μm cellulosenitrat of cellulose-esters membraanfilter (4.2.2) (zie 6.5.2 Uitzondering A1). De zuur 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, met een minimaal filtratievolume van 10 ml. 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 het agarmedium (zonder behandeling op BCYE, met behandeling(en) op antibioticaplaat) met aandacht dat er geen luchtbellen onder gevangen zitten.

6.4 BEHANDELINGEN

6.4.1 Warmte behandeling

Breng het geconcentreerd of ongeconcentreerd watermonster in een steriel recipiënt en plaats dit 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. Als veel monsters samen worden behandeld of grote monsters worden behandeld of dikwandige recipiënten worden gebruikt, controleer de temperatuur in een afzonderlijk 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 Zuur behandeling

Verdun één 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.

Zuur 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 zuuroplossing.

6.5 KWEEK

6.5.1 Watermatrix A: drinkwatermonsters met een lage concentratie *Legionella* en een lage concentratie interfererende micro-organismen

Spatel (4.2.9) en inoculeer 0,1 (of 0,2) ml van elk net gevortexte geconcentreerd deel van het monster (onbehandeld, warmte behandeld en zuur behandeld) van de membraanfiltratie met elutieprocedure (zie 6.3.2) 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 plaat (5.1.7).

Plaat bijkomend het watermonster **rechtstreeks** uit. 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) of MWY-agar (5.1.6) of GVPC-agar (5.1.7).

		Stap 1	
		Watermatrix A	
		Drinkwatermonster met heel lage concentratie interfererende micro-organismen (6.5.1)	
		Stap 4	
Stap 2	Stap 3	BCYE ¹	BCYE+AB of MWY of GVPC ²
polycarbonaat of polyethersulfon membraanfiltratie 0,2 µm minstens 250 ml en elutieprocedure met glaspereels	onbehandeld	x	x
	warmte behandeling	x	x
	zuur behandeling	x	x
rechtstreekse uitplating	onbehandeld	x	x

¹ Enkel voor de membraanfiltratie kan BCYE eventueel vervangen worden door BCYE+AB op voorwaarde dat de tweede antibiotica plaat MWY of GVPC is.

² Minstens één selectieve plaat of meerdere van deze selectieve antibiotica platen.

6.5.2 Uitzondering A1: voor drinkwatermonsters met een heel lage concentratie *Legionella* en een lage concentratie interfererende micro-organismen: rechtstreekse plaatsing van membraanfilter op agarmedium na membraanfiltratie

Filtreer het monster (zie 6.3.3) 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).

		Stap 1	
		Watermatrix A	
		Drinkwatermonster met lage concentratie interfererende micro-organismen (6.5.2)	
		Stap 4	
Stap 2	Stap 3	BCYE	BCYE+AB of MWY of GVPC ³
cellulose-nitrat of-ester membraanfiltratie 0,2 of 0,45 µm en filter op plaat (optioneel met warmte voorbehandeling)	onbehandeld	x	
	zuur behandeling		x

³ Minstens één selectieve plaat of meerdere van deze selectieve antibiotica platen.

6.5.3 Watermatrix B: koeltorenwaters met hoge concentratie interfererende micro-organismen

Gebruik watermonsters met een hoge concentratie van interfererende micro-organismen ongeconcentreerd (voor rechtstreekse uitplating) en geconcentreerd (membraanfiltratie + elutieprocedure zie 6.3.2) (en bijkomend het concentraat eventueel verdund (1:10)). Verdeel telkens elk submonster in drie porties. Gebruik een portie onbehandeld, het tweede gedeelte voor warmte behandeling (6.4.1) en het derde gedeelte voor behandeling met zuuroplossing (6.4.2). Spatel (4.2.9) en inoculeer voor **R 0,1 ml** en voor de MF 0,1 (of 0,2) ml van elk net gevortexte gedeelte van de submonsters minstens op één plaat MWY-agar (5.1.6) of op één plaat GVPC-agar (5.1.7).

		Stap 1
		Watermatrix B
		Watermonster: koeltorenwater met hoge concentratie interfererende micro-organismen (6.5.3)
		Stap 4
Stap 2	Stap 3	MWY of GVPC ⁴
polycarbonaat of polyethersulfon membraanfiltratie 0,2 µm van beoogd volume 250ml en elutieprocedure met glasparsels	onbehandeld	x
	warmte behandeling	x
	zuur behandeling	x
rechtstreekse uitplating	onbehandeld	x
	warmte behandeling	x
	zuur behandeling	x

⁴ Minstens één selectieve plaat of meerdere van deze selectieve antibiotica platen.

6.5.4 Watermatrix C: zwaar beladen koeltorenwaters met extreme hoge concentratie interfererende micro-organismen

Gebruik watermonsters met een extreem hoge concentratie van interfererende micro-organismen ongeconcentreerd (voor rechtstreekse uitplating) en geconcentreerd op een 0,45 µm filter (membraanfiltratie + elutieprocedure zie 6.3.2) (en bijkomend het concentraat eventueel verdund (1:10)).

Behandel de geconcentreerde fractie en het ongeconcentreerd watermonster voor rechtstreekse uitplating telkens met warmte (6.4.1) en met zuur (6.4.2) en een derde portie met een combinatie van warmte en zuur. Voor deze gecombineerde behandeling wordt eerst de warmte behandeling (zie 6.4.1) gedaan, gevolgd door de zuur 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 met warmte behandelde monster af te koelen tot kamertemperatuur voordat de zuur behandeling wordt uitgevoerd.

Spatel (4.2.9) en inoculeer voor **R 0,1 ml** en voor de MF 0,1 (of 0,2) ml van elk net gevortexte gedeelte van de submonsters minstens op één plaat MWY-agar (5.1.6) of op één plaat GVPC-agar (5.1.7).

		Stap 1
		Watermatrix C
		Watermonster: zwaar beladen koeltorenwater, ander afvalwater met extreem hoge concentratie interfererende micro-organismen (6.5.4)
		Stap 4
Stap 2	Stap 3	MWY of GVPC ⁶
polycarbonaat of polyethersulfon membraanfiltratie 0,45 µm ⁵ van beoogd volume 250ml en elutieprocedure met glaspereels	warmte behandeling	x
	zuur behandeling	x
	combinatie eerst warmte dan zuur behandeling	x
rechtstreekse uitplating (eventueel na verdunning)	warmte behandeling	x
	zuur behandeling	x
	combinatie eerst warmte dan zuur behandeling	x

⁵ Filtratie van beoogd volume van 250ml op een 0,45 µm filter, desnoods gebruik van 2 filters; beide filters worden samen in één elutiepotje met parels geëluëerd.

⁶ Minstens één selectieve plaat of meerdere van deze selectieve antibiotica platen.

6.5.5 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 **10±1 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 gespikete 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±1 d nodig hebben om de groei te bekomen.

6.5.6 Aflezen van de platen

Controleer de platen voor het eerst op dag 3, 4 of 5, dit ter identificatie van monsters waar zich overgroei voordoet, gevolgd door minstens een finale controle aan het einde van de incubatieperiode.

Voor drinkwater: bij de eerste aflezing op dag 3, 4 of 5, dient minstens het tijdstip van de controle geregistreerd te worden. Wanneer overgroei dreigt, dient ook het resultaat van de telling geregistreerd te worden. Bij de daaropvolgende aflezingen dienen het tijdstip en het resultaat van de controle geregistreerd te worden.

Voor koeltorenwater: bij elke aflezing dient het tijdstip en het resultaat van de controle geregistreerd te worden.

Het uiteindelijke kwantitatieve resultaat is enkel beschikbaar aan het einde van de incubatieperiode (6.5.5). 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*.

Legionella kolonies zijn in het algemeen witgrijs maar kunnen ook in andere kleuren verschijnen. Ze hebben een karakteristieke morfologie: kolonies hebben een gave rand en vertonen een typische matglazen uitstraling⁷.

⁷ De kolonies *Legionella pneumophila* vertonen vaak een groenroze rand onder een stereomicroscop

6.5.7 Bevestiging van Legionella verdachte kolonies met ultraviolet licht

Onder een ultraviolet lamp (4.2.11), autofluoresceren verschillende soorten *Legionella* kolonies als helderblauw/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 langer 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.

Legionella verdachte kolonies die onder UV licht helderblauw/briljant wit oplichten hoeven niet te worden bevestigd en worden gerapporteerd als *Legionella* species (non-pneumophila). Van de presumptieve Legionella die niet onder UV fluoresceren worden nog steeds (minstens) 6 kolonies verder bevestigd via de gebruikelijke bevestigingsstappen zie 6.6, 6.7 en 6.8 (overenting / serotypering of Maldi-Tof / serotypering).

6.6 BEVESTIGING VAN PRESUMPTIEVE LEGIONELLA KOLONIES OP CULTUURMEDIA BCYE(+CYS) EN BCYE-CYS AGAR

In de loop van de incubatie van de platen die onder 6.5.5 wordt uitgevoerd dienen er **per behandeling** bevestigingstesten gedaan te worden, vertrekkend van de pla(a)t(en) met het hoogste aantal **presumptieve** *Legionella* kolonies per volume-eenheid (zie 6.5.6). Kies per behandeling en per morfologische vorm minstens twee presumptieve *Legionella* kolonies, met een minimum van 6 presumptieve *Legionella* kolonies in totaal van alle behandelingen (indien het totaal presumptieve *Legionella* kolonies minder dan zes kolonies bedraagt worden alle presumptieve *Legionella* kolonies bevestigd).

Legionella kolonies behorende tot verschillende species en/of serotypes vertonen doorgaans verschillen⁸ in morfologie of kleur, en zijn mogelijks 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.

Voor de bevestiging worden de presumptieve *Legionella* bacteriën overgeënt met een entnaald met Pt-öse (4.2.8) op één BCYE(+cys) 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(+cys)-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. Platen die na drie dagen geen groei vertonen worden verder geïncubeerd tot 5 dagen. *Legionella* vertoont groei op de BCYE(+cys) en niet op de BCYE-cys. Noteer de resultaten voor elke plaat.

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.

Vanuit de Legiolert tray wordt na zeven dagen incubatie voor de bevestigingen van *Legionella pneumophila* de achterwand van minstens zes van de bruingekeurde grote en kleine (indien van toepassing) cupjes doorprikt en opgezuiverd. Er kunnen groen gekleurde cupjes voorkomen. Deze wijzen niet onmiddellijk op de aanwezigheid van *Legionella pneumophila*, maar kunnen wijzen op

⁸ Belangrijk: het kan voorkomen dat verschillende species of serotypes toch eenzelfde morfologie vertonen, en andersom kunnen kolonies met verschillende morfologie toch tot eenzelfde species of serotype behoren.

de aanwezigheid van *Pseudomonas* (geeft interferentie aan de kleur) en worden enkel meegeteld indien de bevestigingstest (via uitplating/serotypering) aantoont dat het om *Legionella pneumophila* gaat.

6.7 BIJKOMENDE BEVESTIGING VIA SEROTYPERING VAN PRESUMPTIEVE *LEGIONELLA* KOLONIES MET EEN AGGLUTINATIE OF IMMUNOASSAY TEST

De *Legionella* kolonies dienen bijkomend bevestigd te worden via serotypering met een agglutinatie kit of met een immunochromatografische test (5.1.10). Alle presumptieve *Legionella* bacteriën die groei vertonen op de BCYE(+cys) en niet op de BCYE-cys uit 6.6. worden getest volgens de procedure in 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.

Met bepaalde commerciële serologische kits voor serotypering van "*Legionella species non-pneumophila*" worden er slechts een zevental species bepaald (*L. longbeachae* 1 en 2, *L. bosemanii*, *L. dumofii*, *L. gormanii*, *L. jordanis*, *L. micdadei*, *L. anisa*).

Wanneer presumptieve *Legionella* niet groeien op BCYE-L-cysteïne en wel groeien BCYE+L-cysteïne en niet reageren met het *Legionella species* reagens betekent dit niet dat ze geen *Legionella* zijn. Ze kunnen tot een ander species behoren dan *L. pneumophila*, *L. longbeachae*, *L. bosemanii*, *L. dumofii*, *L. gormanii*, *L. jordanis*, *L. micdadei*, *L. anisa*. Hier biedt het gebruik van bv. MALDI-TOF (zie 6.8) een grote ondersteuning voor een correcte identificatie van presumptieven die mogelijk behoren tot species die niet met een kit geserotypeerd worden.

De immunoassay test daarentegen laat de detectie toe van alle *Legionella species*. Met een dergelijke kit worden om elk *Legionella*-isolaat te classificeren monoklonale antilichamen Mab (monoclonal antibodies) tegen verschillende componenten van de bacteriecelwand gebruikt. Mabs tegen de peptidoglycan-geassocieerd lipoproteïne PAL voorkomend in alle *Legionella*-soorten wordt gebruikt voor de *Legionella* genusdetectie.

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* en ter aanvulling van de bevestigingstesten kan gebruik gemaakt worden van de MALDI-TOF MS technologie. Hiervoor dient wel een verificatie uitgevoerd te worden conform ISO 16140.

Voor de identificatie van *Legionella* door middel van MALDI-TOF MS dient zoals aangegeven in 6.6 per behandeling en per morfologische vorm minstens twee presumptieve *Legionella* kolonies, met een minimum van 6 presumptieve *Legionella* kolonies in totaal van alle behandelingen getest te worden. Voor deze bevestiging kan er weliswaar gekozen worden om voorafgaandelijk geen overenting op BCYE(+cys) (5.1.4) / BCYE-cys plaat of evenwaardig (5.1.8) uit te voeren.

7 SPECIFIEKE RICHTLIJNEN VOOR ANALYSE VAN AFVALWATER UIT EEN WATERZUIVERINGINSTALLATIE/BIOLOGIEBEKKEN (WZI/BB)

7.1 PRINCIPE

De bepaling van Legionella in afvalwater van een WZI/BB dient uitgevoerd te worden gebaseerd op de methode voor watermatrix C mits volgende aanpassingen nodig om de analyse van dergelijke zwaar beladen monsters toe te laten.

De membraanfiltratie met deze matrix is heel moeilijk uitvoerbaar en genereert geen bruikbare resultaten. Voor kwantificatie van *Legionella* bacteriën dient er geen membraanfiltratie uitgevoerd te worden maar enkel rechtstreekse uitplatingen met inbegrip van voorbehandelingen en verdunningen. Vanwege de aard van het afvalwater is het eluaat van de membraanfilter zo beladen met slurry en storende flora dat de groei van Legionella op de selectieve platen geheel of gedeeltelijk onderdrukt wordt.

Doorgaans vertoont een watermonster van een WZI/BB - wanneer het onaangeroerd staat - een supernatans en een slibfase dat uitzakt. De concentratie van Legionella is één tot twee logwaarden hoger in de uitgezakte slurryfase dan in het supernatans.

Daarom wordt een voorafgaande ultrasone behandeling uitgevoerd alsook wordt er tussen elke behandeling en elke analysestap een grondige homogenisatie gehandhaafd.

Naast de rechtstreekse uitplatingen na behandelingen met zuur en gecombineerde behandeling warmte met zuur worden verdunningen van deze fracties in meervoud uitgeplaat.

7.2 KWEEK

Analyseer watermonsters uit WZI/BB (extreem hoge concentratie van interfererende micro-organismen) enkel via rechtstreekse uitplating.

Meng het afvalwatermonster grondig door herhaaldelijk omkeren (± 15 keer).

Neem een volume van 20-40 ml en breng dit over in een steriel recipiënt van 50 ml.

Plaats het recipiënt in een onverwarmd ultrasoon waterbad van 40-45 kHz en zorg ervoor dat het niveau van het waterbad zich boven het monsterniveau bevindt; pas ultrasoon toe gedurende 9 minuten.

Homogeniseer grondig bij elk volgende analysestap.

Behandel een eerste portie van het watermonster voor rechtstreekse uitplating enerzijds met zuur (6.4.2) en een tweede portie met een combinatie van warmte en zuur. Voor deze gecombineerde behandeling wordt eerst de warmte behandeling (zie 6.4.1) gedaan, gevolgd door de zuur behandeling (zie 6.4.2). Het is belangrijk om het met warmte behandelde monster af te koelen tot kamertemperatuur voordat de zuur behandeling wordt uitgevoerd.

Beide fracties zijn na de behandeling met zuur reeds als verdunning 1:10, verdun beide fracties verder tot 1:100 en tot 1:1000 in steriel diluent (5.1.1). Spatel (4.2.9) en inoculeer 0,1 ml van elk net gevortexte submonster op minstens drie platen GVPC-agar (5.1.7).

Stap 2		Stap 3	Stap 1
ultrasoon 9 min rechtstreekse uitplatingen		Z 1/10: zuur behandeling (monster 1 : 9 zuurverhouding)	Watermatrix C afvalwater van WZI/BB
		Z 1/100 verdere verdunning tot 1/100	Stap 4 GVPC
		Z 1/1000 verdere verdunning tot 1/1000	3 x
		TZ 1/10: warmte / zuur behandeling (monster 1 : 9 zuurverhouding)	3 x
		TZ 1/100 verdere verdunning tot 1/100	3 x
		TZ 1/1000 verdere verdunning tot 1/1000	3 x
			3 x

Vervolg de analyse zoals 6.5.5 en verder. Het belang van nemen van foto's wordt benadrukt alsook het noteren van de hoedanigheid van het monster (aanwezigheid of niet van een uitgezakte slurryfase).

8 REAL-TIME PCR-DETECTIE EN KWANTIFICATIE VAN *LEGIONELLA PNEUMOPHILA* IN DRINKWATER VOOR SCREENING IN KADER VAN EEN BEHEERSPLAN

8.1 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 fluorofor 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).

Voor implementatie is het dus 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.

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

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

- Evaluatie van de kalibratiecurve
- Verificatie van de kwantificatielimiet LQqPCR uit de validatieprocedure
- Verificatie van de detectielimiet LDqPCR
- Robuustheid van de methode, op steriele watermonsters en op een complexe matrix
- Deelname aan een interlaboratorium ringtest.

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).

8.3 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 bemonsterd⁹, 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.

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, met de verwijzing naar de gebruikte methode.

9 SPECIFIEKE RICHTLIJNEN BIJ EEN KLINISCH BEVESTIGDE LEGIONELLOSE OF EEN UITBRAAK

9.1 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 Departement Zorg een indicatief *Legionella* resultaat doorgegeven te worden in het kader van verplichte melding bij vastgestelde Legionellose of een uitbraak.

De incubatie wordt dan verdergezet 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 Departement Zorg.

⁹ ZIE WAC/I/A/001 OF WAC/I/A/002

9.2 BEVESTIGING VAN PRESUMPTIEVE LEGIONELLA KOLONIES

Indien species-identificatie van de *Legionella* kolonies moet worden uitgevoerd (zie ISO 11731: 2017 Bijlage G) en opgenomen in het testrapport, dienen alle typische morfologieën uit alle platen te worden bevestigd en worden de identificaties gemeld.

9.3 SCREENING MET PCR

Screening (zie 7.3) enkel op *Legionella pneumophila* is niet van toepassing bij een klinisch bevestigde Legionellose of bij een uitbraak, gezien ook *Legionella non-pneumophila* Legionellose kunnen veroorzaken.

10 RAPPORTERING

10.1 FORMULES

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

- ✓ Membraanfiltratie met elutieprocedure (onrechtstreekse filtratie)

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

- ✓ Rechtstreeks uitplating

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

- ✓ Membraanfiltratie, filter op plaat

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

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 totaal 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)

10.2 RAPPORTERING UIT LEGIOLERT

Bepaal aan de hand van de bevindingen van de serotypering de waarden omgerekend in kve/l watermonster van *Legionella pneumophila* serotype 1 en van *Legionella pneumophila* serotype 2-14 (2-15) vanuit Legiolert.

Voor de rapportering van *Legionella* species (non- *pneumophila*) zie verder 10.3.

10.3 AFSPRAKEN MET BETREKKING TOT RAPPORTERING

Rapporteer voor zowel **drinkwater** en **koeltorenwater**:

Legionella pneumophila serotype 1

Legionella pneumophila serotype 2-14 (2-15)

Legionella species (non- *pneumophila*)

Rapporteer telkens de hoogste omgerekende waarde in kve/l uit de voor de bevestigingstesten weerhouden platen, onafhankelijk vanuit membraanfiltratie of rechtstreekse uitplating, rekening houdend met de hieronder beschreven bijkomende voorwaarden. Bij het bepalen van de hoogste omgerekende waarde in kve/l dient rekening gehouden te worden met de verdunning.

Bij de rapportering vanuit de rechtstreekse uitplating (R) gelden voor elk van de verschillende *Legionella* species volgende bijkomende voorwaarden:

- indien het totaal aantal Legionellakolonies voor elk van de verschillende *Legionella* species op een plaat minstens 3 bedraagt en dus een hoogste omgerekende waarde van ≥ 30.000 kve/l geeft, wordt vanuit de rechtstreekse uitplating gerapporteerd
- in de andere gevallen wordt gerapporteerd uit de membraanfiltratie met elutie
- indien de aanwezigheid van kolonies op de R een hoogste omgerekende waarde geeft en deze < 30.000 kve/l bedraagt, moet de aanwezigheid van deze kolonies als opmerking op het analyseverslag worden vermeld.

Dit kan op twee manieren:

- Zonder indicatieve waarde:
Een hoger eindresultaat van de rechtstreekse uitplating werd niet in rekening gebracht wegens een laag aantal kolonies per species geteld
- Met indicatieve waarde:

Een hoger eindresultaat van de rechtstreekse uitplating (indicatief: x kve/l) werd niet in rekening gebracht wegens een laag aantal kolonies per species geteld

- wanneer er geen resultaat is bij membraanfiltratie maar wel 1 of 2 kolonies op rechtstreekse uitplating moet een volwaardig eindresultaat gerapporteerd worden van bv. 10.000 resp. 20.000 kve/l; als opmerking wordt dan op het analyseverslag aangegeven dat enkel een resultaat bekomen werd vanuit de rechtstreekse uitplating op basis van een laag aantal kolonies nl. 1 of 2 per species.

Rapporteer bijkomend voor **koeltorenwater**:

het totale aantal *Legionella spp.*, namelijk de som van de waarden *Legionella pneumophila* serotype 1 + *Legionella pneumophila* serotype 2-14(15) + *Legionella species* non-pneumophila.

Hierbij worden waarden < rapportagegrens als nul beschouwd.

Zoals aangegeven in 6.7 worden niet alle *Legionella species* non-pneumophila gedetecteerd bij gebruik van bepaalde agglutinatie kits. Het te rapporteren aantal *Legionella species* non-pneumophila is dan het aantal dat groeit op BCYE+cys én geen groei vertoont op BCYE-cys én via de bevestigingstest niet als *Legionella pneumophila* bepaald wordt.

Uitzonderlijk kan bij de serotypering geen onderscheid gemaakt worden tussen *Legionella pneumophila* serotype 1 en serotype 2-14 (2-15):

- wanneer een kruisreactie ontstaat, d.w.z. wanneer de serotypering geen éénduidig resultaat oplevert
- wanneer morfologisch identieke presumptieve *Legionella* kolonies bij de serotypering geen éénduidig resultaat opleveren.

Rapporteer in dit geval niet *Legionella pneumophila* serotype 1 en *Legionella pneumophila* serotype 2-14 (2-15) afzonderlijk, maar de som van beiden.

Bij afwezigheid, wordt de rapportagegrens vermeld in kve/l berekend volgens de gebruikte procedure (zie ISO 11731: 2017 tabel J.1). Indien een verdunningsfactor van toepassing is wordt de rapportagegrens met deze factor verhoogd.

In geval er geen of slechts een tussentijds resultaat beschikbaar is vanwege overgroei, is een opmerking op het analyseverslag vereist:

- indien er van alle geïncubeerde platen door overgroei geen enkel resultaat voor *Legionella* kan gegenereerd worden, dan betekent dit niet dat er geen *Legionella* aanwezig is in het watermonster. Hier dient de opmerking aangegeven te worden dat 'door overgroei van interfererende flora niet kan gegarandeerd worden dat *Legionella* in het watermonster afwezig is'. In geen geval mag het resultaat uitgedrukt worden als "niet gedetecteerd" in het onderzochte volume of mag < rapportagegrens als resultaat doorgegeven worden.
- 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.

Rapporteer voor **afvalwater**:

Sommeer de tellingen van de drie (of meer indien uitgevoerd) platen per behandeling. Rapporteer de hoogste omgerekende waarde in kve/l uit alle behandelingen, rekening houdend met de verdunningen voor

Legionella pneumophila serotype 1

Legionella pneumophila serotype 2-14 (2-15)

Legionella species (non- *pneumophila*)

Voor de detectielimiet rapporteer deze van de verdunning waarvan de platen geen overgroei vertonen en dus interpreteerbaar zijn.

10.4 VOORBEELDEN

- Filtratie van drinkwater 1000 ml; uitplatingen 100 µl

	DW aantal kolonies omgerekend met verdunning 1/10 via zuurbehandeling							
	R		MF elutie in 5 ml oplossing					
			onbehandeld		warmte		zuur	
	BCYE	BCYE+AB	BCYE	MWY	BCYE	MWY	BCYE	MWY
<i>Legionella pneumophila</i> serotype 1	3	0	273	242	176	192	320	180
<i>Legionella pneumophila</i> serotype 2-14(15)	0	0	38	36	40	27	30	40
<i>Legionella species</i>	0	0	0	0	0	0	0	0

- rapporteer 3.10^4 of 30.000 kve/l *Legionella pneumophila* serotype 1
 2.10^3 of 2.000 kve/l *Legionella pneumophila* serotype 2-14(15)
 < 50 kve/l *Legionella species* (non- *pneumophila*)

- Filtratie van koeltorenwater 250 ml; uitplatingen 100 µl

	AW scenario B aantal kolonies omgerekend met verdunning 1/10 via zuurbehandeling								
	R			MF elutie in 5 ml oplossing					
	GVPC			onbehandeld		warmte		zuur	
	onbehandeld	warmte	zuur	MWY	GVPC	MWY	GVPC	MWY	GVPC
<i>Legionella pneumophila</i> serotype 1	0	0	0	overgroei	38	46	35	70	40
<i>Legionella pneumophila</i> serotype 2-14(15)	0	0	0		overgroei	0	0	0	0
<i>Legionella species</i>	0	1	0		24	31	26	30	20

- rapporteer $1,4.10^4$ of 14.000 kve/l *Legionella pneumophila* serotype 1
 < 200 kve/l *Legionella pneumophila* serotype 2-14(15)
 $6,2.10^3$ of 6.200 kve/l *Legionella species* (non- *pneumophila*) (opmerking: een hoger eindresultaat van de rechtstreekse uitplating (10.000 kve/l *Legionella species* (non-*pneumophila*)) werd niet in rekening gebracht wegens een laag aantal kolonies geteld)
 Totaal aantal *Legionella*: $2,02.10^4$ of 20.200 kve/l

- Analyse van afvalwater: watermonsters uit WZI
 Tellingen van rechtstreekse uitplating (100 µl) op de drie GVPC platen voor de behandelingen

Z 1/1000 : *Legionella pneumophila* serotype 1 7, 31, 19

TZ 1/1000 : *Legionella pneumophila* serotype 1 15, 20, 6

voor zuur behandeling sommeer $7 + 31 + 19 = 57$

voor TZ behandeling sommeer $15 + 20 + 11 = 46$

→ rapporteer

omgerekend $\frac{57 \times 1000 \times 1000}{0,3}$ (0,3 ml uitplaten en omrekenen naar 1 liter, wegens verdunning 1/000)

$1,9.10^8$ kve/l *Legionella pneumophila* serotype 1

Voor de detectielimiet rapporteer aannemend dat de verdunning 1/100 interpreteerbaar is

< 3.10^5 kve/L *Legionella pneumophila* serotype 2-14(15)

< 3.10^5 kve/L *Legionella species* (non-*pneumophila*)

omgerekend $\frac{1 \times 1000 \times 100}{0,3}$ (0,3 ml uitplaten en omrekenen naar 1 liter, wegens verdunning 1/100)

10.5 MINIMALE INHOUD RAPPORT

Vermelding in het rapport:

- de resultaten
- het volume van het in behandeling genomen watermonster
- de verwijzing naar de betreffende WAC methode en de verwijzing van het gebruikte scenario of watermatrix
- 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)

11 REFERENTIES

- ISO 11731 (2017) Water quality - Enumeration of *Legionella*
- ISO 8199:2018 Water quality - General requirements and guidance for microbiological examinations 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
- Bevestiging van Legionella verdachte kolonies [met ultraviolet licht](#) die geïsoleerd zijn uit water.
- 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)
- [Legiolert Idexx: NF validation Certificate No.: IDX 33/06-06/19](#)
- [ASTM D8429-21: Standard Test Method for Legionella pneumophila in Water Samples Using Legiolert](#)
- <https://www.zorg-en-gezondheid.be/sites/default/files/atoms/files/Legionella%20Final.pdf>
- MALDI-TOF MS
<http://www.gene-quantification.de/qpcr-ngs-2013/posters/P036-qPCR-NGS-2013.pdf>
- http://www.afsca.be/laboratoria/labinfo/_documents/2015-04_labinfo13-p12_nl.pdf
- Pavlovic, Melanie, et al. "Application of MALDI-TOF MS for the identification of food borne bacteria." The open microbiology journal 7 (2013): 135.
- <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030147972102421X?via%3Dihub>