

Detectie van legionella in afvalwater conform NEN-EN-ISO 11731

Griëtte Bosman
5 oktober 2022



Inhoud

- Legionella onderzoek in verschillende matrixen
- Legionella detectie matrix C
- Legionella bevestiging m.b.v. PCR
- Legionella pneumophila serotypering
- Legionella rapportage

Legionella onderzoek in verschillende matrixen

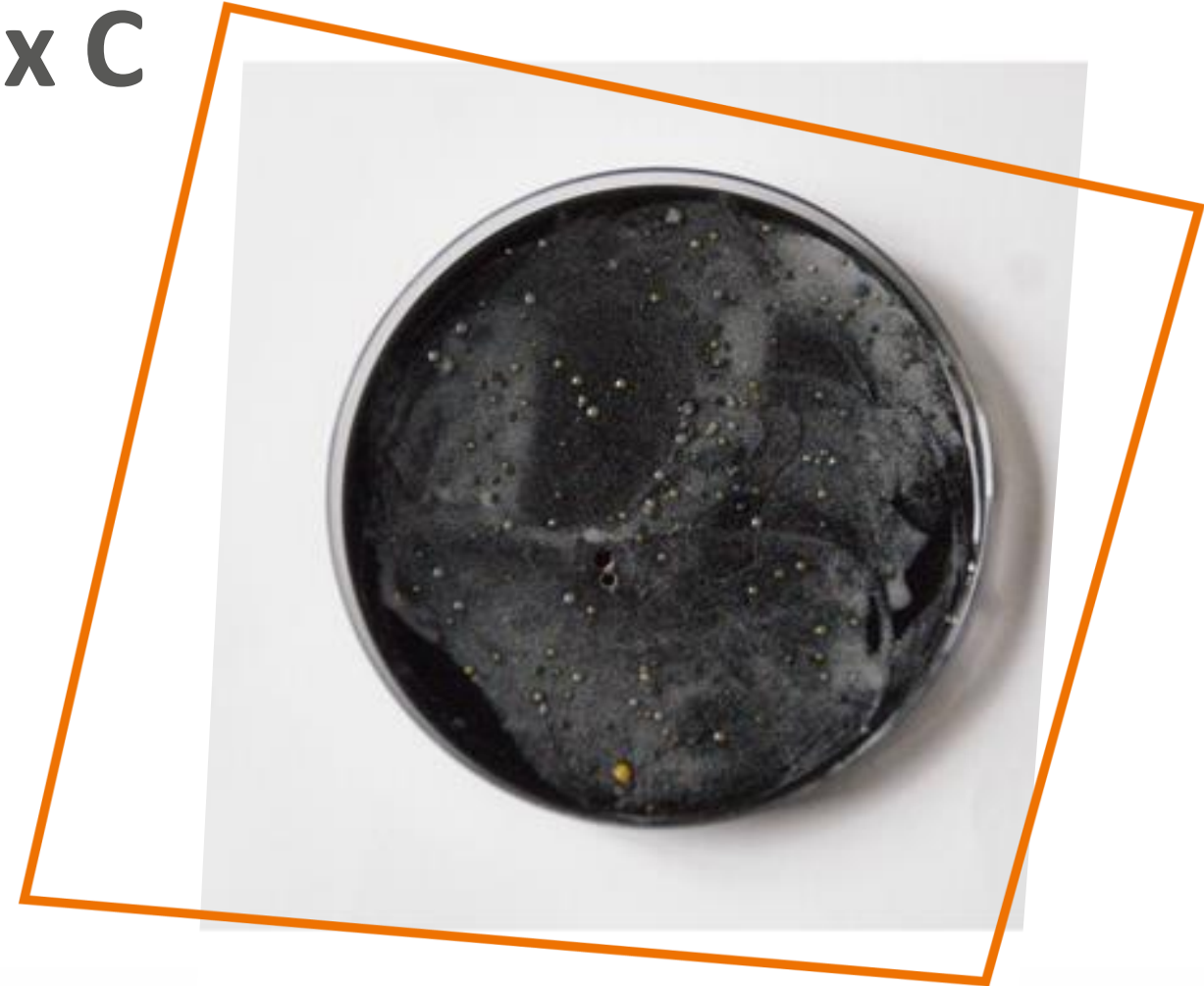
		Stap 1									
		matrix A			matrix B			Matrix C			
		Stap 4									
		Cultuur media									
Stap 2	Stap 3	procedure	A	B	C	A	B	C	A	B	C
direct beplaten	zonder behandeling	1	A	A	O		O	A			
	hitte behandeling	2	O	O	O		O	A			
	zuur behandeling	3	O	O	O		O	A			
	combinatie hitte/zuur	4					O	O		O	R
filtratie membraam direct op plaat	zonder behandeling	5	A	O	O						
	hitte behandeling	6	O	O	O		O	O			
	zuur behandeling	7	O		A		O	O			
filtratie met was procedure	zonder behandeling	8	A		A		O	A			
	hitte behandeling	9	A		A		O	A			
	zuur behandeling	10	A		A		O	A			
beplaten na verdunnen	zonder behandeling	11	O*	O*	O*		O*	A*			
	hitte behandeling	12	O*	O*	O*		O*	A*			
	zuur behandeling	13	O*	O*	O*		O*	A*			
	combinatie hitte/zuur	14					O*	O*		O**	R**

O= optie, A= aanbevolen * 1 op 10 verdunning ** 1 op 10 en 1 op 100 verdunning

Legionella detectie matrix C

Lastige aspecten analyse

- Geen concentratie techniek zoals membraam filtratie mogelijk door sterke verontreiniging van het monster en een extreem hoge concentratie interfererende micro-organismen.
- Enige wettelijke kweekmethode directe beplating al dan niet verdund (hogere detectiegrens) met specifieke kweekplaten met antibiotica.
- Aanwezigheid van veel stoorflora, ook na inzetmethode matrix C.



Legionella detectie matrix C

Uitvoering analyse inzetten

- 5 ml monster in potje met glasparels.
- Hittebehandeling: 30 minuten bij 50°C.
- Zuurbehandeling: 1 op 9 in buffer met pH van 2 gedurende 5 min+/-30 sec.
- Pipetteren 500 µl op 1x BCYE-cys, 2xBCYE+AB en 2x MWY
- Verdeel monstermateriaal op de plaat met drigalskispatel.
- Platen verpakken voor vochtig milieu.
- Incuberen bij 36°C gedurende 7-10 dagen +/- 8 uur.



Legionella detectie matrix C

Uitvoering analyse telling

- Elke plaat beoordelen op stoorflora en aantal verdachte legionella kolonies met behulp van fluorescentie en stereo microscoop.

- *Bovenste foto: linker plaat verdachte legionella kolonies met stoorflora, rechter plaat geen verdachte kolonies (plaat bevat een pseudomonas stam)*
- *Onderste foto: stoorflora met 1 fluorescerende verdachte kolonie*



Legionella detectie matrix C

Uitvoering analyse telling

Typische Legionella-kolonies hebben;

- Matglazen uiterlijk
- Korrelige structuur aan de rand van de kolonie
- Kleur grijs wit met of zonder blauw/paarse soms groene rand
- Verschillend van grootte, pneumophila zijn over het algemeen groot, non pneumophila zijn er van groot tot bijna niet zichtbaar op de plaat met het blote oog.

- Bovenste foto: verdracht legionella pneumophila
- Onderste foto: verdachte legionella non pneumophila onder stereo microscoop



Legionella bevestiging met behulp van PCR

PCR principe

Polymerase Chain Reaction

Een exponentiële vermeerdering van een specifiek DNA fragment in een cyclisch proces tot er genoeg van is om te analyseren.

Real-time PCR

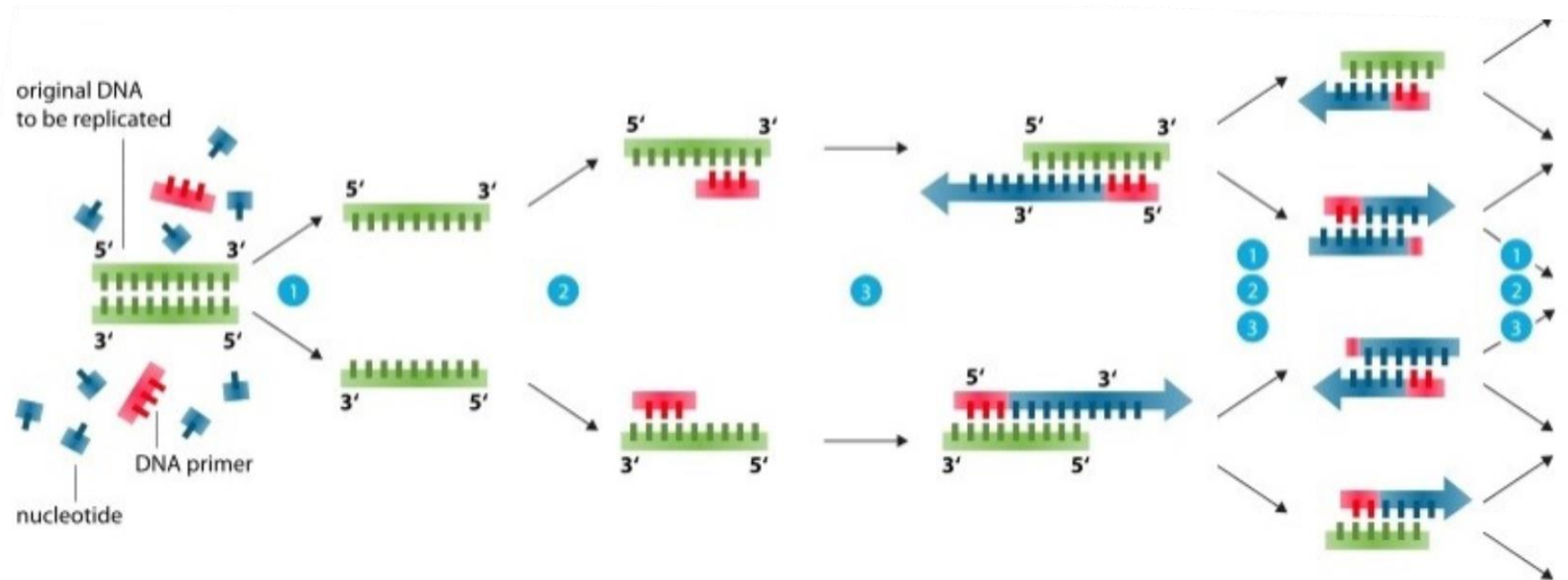
PCR waarbij in elke cyclus de hoeveelheid fluoriserende probes gemeten wordt.



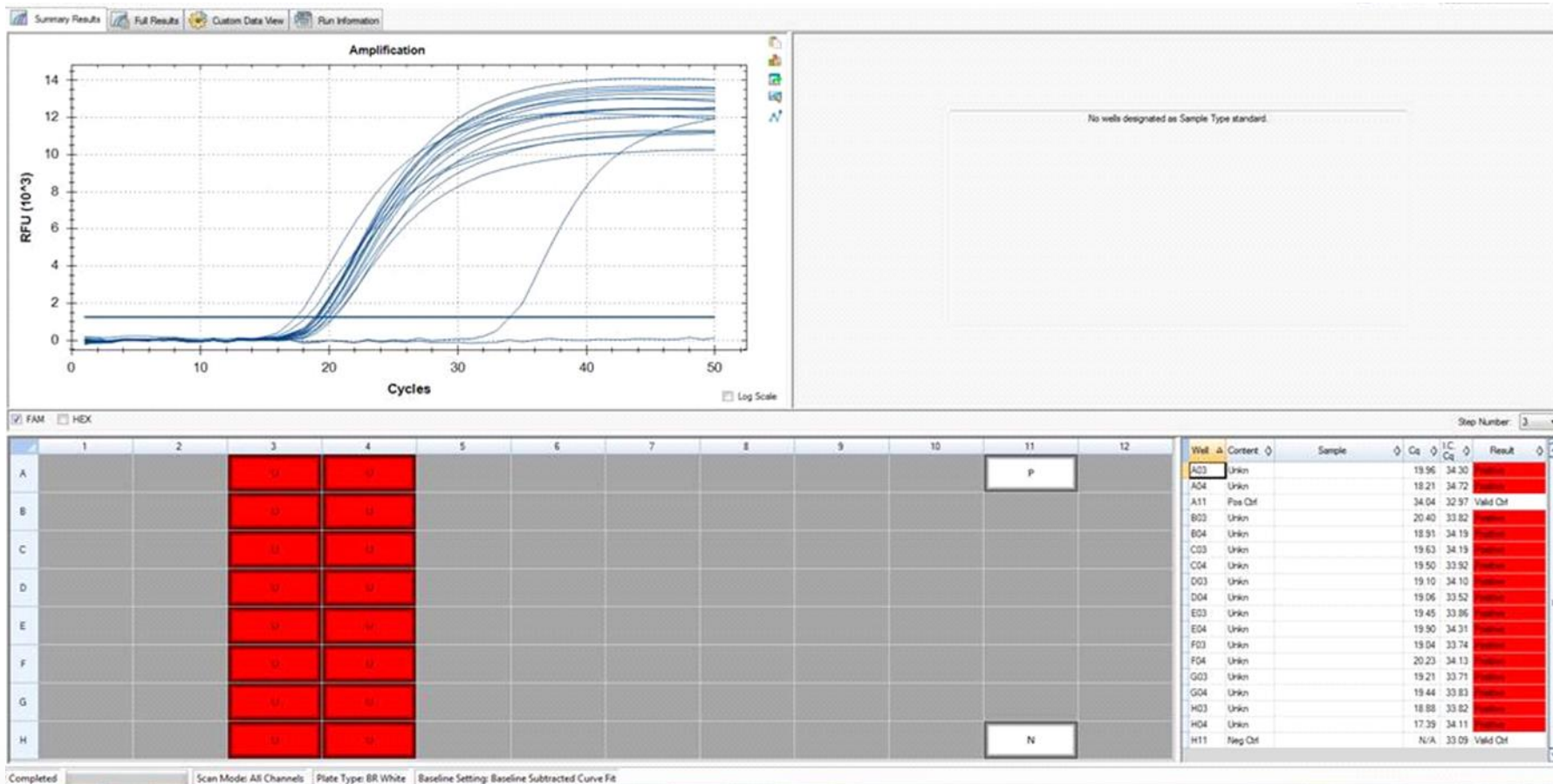
Legionella bevestiging met behulp van PCR

PCR principe

- Stap 1 **Denaturatie**
- Stap 2 **Annealing**
- Stap 3 **Extention**



Legionella bevestiging met behulp van PCR



Legionella aflezen PCR

- Legionella bevestiging legionella spp
- Legionella bevestiging pneumophila

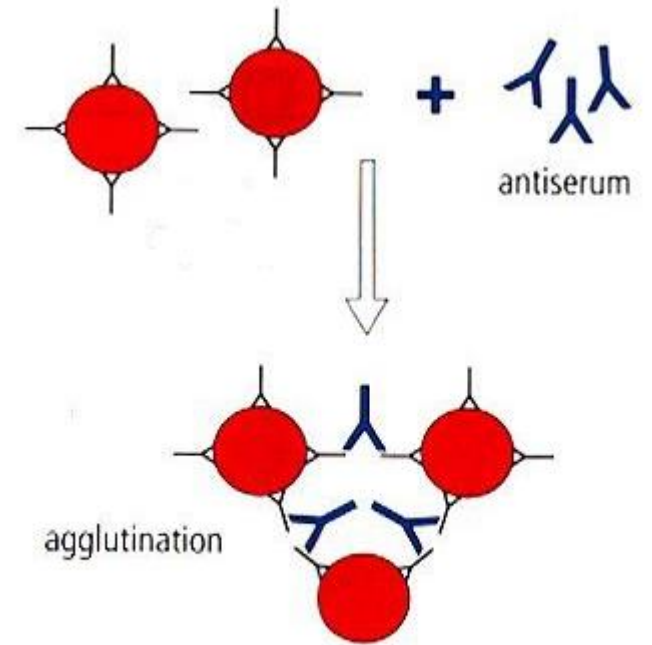
Legionella pneumophila

Serotyping d.m.v. serologische test

- Latex agglutinatie

Agglutinatie is het samenklonteren van gesuspendeerde deeltjes.

Deze test maken gebruik van de antigeen - antilichaam



Legionella rapportage

Matrix C

- Aantoonbaarheidsgrens is <10.000 kve/l
- 1 kolonie op plaat staat bij methode matrix C voor 10.000 kve/l legionella

Analysecertificaat Rapportnummer : 1050624 op 28/07/2022

Opdrachtgever
Kalsbeek B.V.
Koopmansweg 2
9482 WC Tynaarlo

Namens

Object

Projectcode: /
Dumea ordercode: :
Monsternummer: /
Monsterplan: /

Opmerking Normec Dumea:



Normec Dumea
Industrieweg 16
8131 VZ Wijhe
Tel: 0570-524017
Email: info@normecdumea.com

Monsteromschrijving	tp 1 influent (GMB) - yzzin8vw2	tp 1a influent (GMB) - yzzin8vw2	tp 2 influent (FC) - yzzpikns	tp 2a influent (FC) - yzzpikns	tp 3 aeriëltank 1 - yzzat1
Monsterneming	13-07-2022 08:13	13-07-2022 08:14	13-07-2022 08:40	13-07-2022 08:41	13-07-2022 08:19
Ontvangst	13-07-2022	13-07-2022	13-07-2022	13-07-2022	13-07-2022
Aanvang onderzoek	14-07-2022 12:00	14-07-2022 12:00	14-07-2022 12:00	14-07-2022 12:00	14-07-2022 12:00
Einde onderzoek	28-07-2022 13:31	28-07-2022 13:31	28-07-2022 13:31	28-07-2022 13:31	28-07-2022 13:31
Dumea monstercode	220713-037-01U	220713-037-02U	220713-037-03U	220713-037-04U	220713-037-05U
Bemonsteringsmethode	C.kw	C.kw	C.kw	C.kw	C.kw
Type water	Afvalwater	Afvalwater	Afvalwater	Afvalwater	Afvalwater
Temperatuur na 1 liter (°C)	10.8	10.9	6.1	6.1	29.1
Temperatuur constant (°C)					35984
Tappuntnummer	35980	35981	35982	35983	35984
Soort tappunt	Tappunt	Tappunt	Tappunt	Tappunt	Tappunt
Opmerking Dumea					
Opmerking meetpunt					
- Beoordeling vlgs. spec. klant Norm = < 10.000 kve/liter	Voldoet niet	Voldoet niet	Voldoet	Voldoet	Voldoet
- Gefiltreerd volume (ml)	1	1	1	1	1
U Legionella species (kve/liter) gw NEN-EN-ISO 11731 * (L-281-TEST)	20.000	30.000	<10000	<10000	<10000
UQ Legionella typering eigen methode (L281-TEST) *	pneumophila serotype 2-15	pneumophila serotype 2-15			

De resultaten hebben alleen betrekking op het geanalyseerde monster zoals dit is ontvangen, tenzij het monster door Normec Dumea genomen is. In dat geval hebben de resultaten betrekking op het bemonsterde object. Alle cursief weergegeven informatie is aangeleverd door de klant en kan van invloed zijn op de geldigheid van de resultaten. Dit certificaat mag niet anders dan in zijn geheel worden gekopieerd zonder toestemming van Normec Dumea. Dit rapport wordt ook verstuurd naar in regelgeving aangegeven instanties. Op dit certificaat zijn onze algemene voorwaarden van toepassing. De meetonzekerheid van uitgevoerde analyses is bij Normec Dumea opvraagbaar. De uitgevoerde analyses zijn: d'n conform, gw gelijkwaardig aan, emn eigen methode, * n gw NEN-EN-ISO 11731 / isolatie cf / bevest. PCR gw / matrix A; procedure 8, 9 en 10, voedingsbodem A en B - BCYE, detectielimiet <100 kve/l. ** n analyse niet binnen gestelde tijd ingezet, hierdoor is het resultaat mogelijk minder betrouwbaar.

Hoofdanalist Laboratorium
water/microbiologie
Griette Bosman

Pagina 1 van 4

Normec Dumea

Industrieweg 16

8131 VZ Wijhe

0570-524017

info@normecdumea.com

Griëtte Bosman

Griette.Bosman@normecgroup.com

06-15407395

