

Omówienie wytycznych normy PN-EN ISO 11731:2017 dla laboratoriów

**Opracowanie przygotowane przez Firmę Doradczą ISOTOP s.c.
przy współpracy z mikrobiologiem Panią Anną Kozłowską.
www.isotop.pl**

WYDANIE I

Gdańsk, grudzień 2018

**Uwaga! – informacje zawarte w opracowaniu nie są kopią
normy i nie zwalniają laboratoriów z jej posiadania**

Spis treści

CZEŚĆ I	3
INFORMACJE OGÓLNE	3
CZEŚĆ II	5
WYMAGANIA PRAWNE ORAZ POBIERANIE PRÓBEK.....	5
CZEŚĆ III	10
BADANIE BAKTERII <i>LEGIONELLA</i>	10
CZEŚĆ IV	38
POPULARNE METODY USUWANIA BAKTERII <i>LEGIONELLA</i> Z INSTALACJI.....	38
CZEŚĆ V	39
LITERATURA.....	39

Opracowanie w całości ani we fragmentach nie może być powielane ani rozpowszechniane za pomocą urządzeń elektronicznych, mechanicznych, kopiujących, nagrywających i innych, w tym również nie może być umieszczane ani rozpowszechniane w postaci cyfrowej, zarówno w Internecie, jak i w sieciach lokalnych, bez pisemnej zgody Firmy Doradczej ISOTOP s.c.

Koncentrat należy podzielić na 3 porcje. Jedna zostaje nie ruszana. Jedną poddaje się działaniu wysokiej temperatury, a kolejną działaniu kwasu.

UWAGA Z filtra membranowego bakterie można również ściągać za pomocą zdrapywania lub ścierania.

UWAGA Tam gdzie filtracja nie jest możliwa (np. z uwagi na dużą ilość cząstek w wodzie) próbkę można odwirować.

UWAGA Technikę wmywania kwasem można zastosować bezpośrednio w leju na filtrze membranowym.

Przygotowanie próbki

1. Poddawanie działaniu wysokiej temperatury.

Próbkę (zagęszczoną lub nie) umieszcza się w sterylnym naczyniu i w łaźni (50 ± 1) °C na (30 ± 2) min. Małe objętości (≤ 5 ml) powinny być stosowane by zapewnić krótki czas do osiągnięcia przez próbkę wymaganej temperatury). Jeśli wiele próbek poddaje się działaniu temperatury na jeden raz lub gdy stosuje się duże objętości próbki lub ścianki stosowanych naczyń są grube należy monitorować temperaturę w oddzielnym naczyniu, a czas odmierza się od momentu osiągnięcia przez próbkę wymaganej temperatury. Pojemniki z dużą objętością próbki lub grubymi ściankami powinny zostać schłodzone, aby uniknąć przegrzania po wyjęciu z łaźni.

2. Działanie kwasem

Rozcieńczyć jedną objętość próbki (zagęszczonej lub niezagęszczonej) w 9 objętościach roztworu kwasu (według Załącznika D), dobrze wymieszać i zostawić na ($5 \pm 0,5$) min. Jeśli rozcieńczona, potraktowana kwasem próbka jest wykorzystana do szacowania ostatecznego wyniku *Legionella* w próbce należy uwzględnić współczynnik rozcieńczenia. Można zastosować objętości większe niż 0,1 ml do posiana na płytkę aby obniżyć granicę wykrywalności. Działaniu kwasem próbkę można poddać też bezpośrednio w leju na filtrze. Należy rozlać dookoła na filtr 30 ml roztworu kwasu (według Załącznika D) pozostawić na ($5 \pm 0,5$) min., a następnie przefiltrować kwas. Kolejno należy spłukać filtr stosując przynajmniej 20 ml rozcieńczalnika (według Załącznika C) Ważne jest aby rozcieńczalnik nie spłukał z powierzchni leja tego, co nie miało kontaktu z kwasem.

POŻYWKI

Wybór techniki do określania liczby *Legionella* w wodzie zależy od charakteru/pochodzenia próbki i celu badania. Należy podjąć próbę oszacowania mikroflory towarzyszącej w oparciu o doświadczenie i pochodzenie/rodzaj próbki. Należy także zastanowić się nad wymaganym poziomem wykrywalności, aby był jak najniższy.

Załącznik J do normy pomaga dobrać odpowiednią metodę.

Z uwagi na obniżenie granicy wykrywalności możliwe jest zastosowanie wielokrotności płytek z danym podłożem.

Próbki o wysokiej zawartości bakterii *Legionella* i niskiej liczbie bakterii mikroflory towarzyszącej.

Jeśli liczba bakterii *Legionella* spodziewana jest na poziomie 10^4 jtk/1 należy próbkę posiać bez wstępnego przygotowania. Należy posiać i rozetrzeć od 0,1 ml do 0,5 ml próbki na podłoże BCYE i 1 płytkę BCYE+AB. Zanotować objętość próbki.

Próbki o niskiej liczbie bakterii *Legionella* i niskiej liczbie bakterii interferujących.

Najlepiej zastosować bezpośrednią filtrację i umieścić filtr na podłożu BCYE. Filtry potraktowane kwasem należy położyć na więcej niż jednej płytce z selektywnym lub bardzo selektywnym podłożem BCYE+AB lub GVPC lub MWY.

Zastosowanie posiewu filtra membranowego po procedurze mycia

Posiać i rozetrzeć 0,1 ml do 0,5 ml każdej zagęszczonej próbki (nie przygotowywanej wstępnie, poddanej działaniu wysokiej temperatury i poddanej działaniu kwasu) z filtra membranowego z procedurą mycia na jedną płytkę agaru BCYE i na jedną lub więcej na podłoże selektywne lub bardzo selektywne BCYE+AB lub GVPC lub MWY. Zanotować posianą objętość.

Próbki z dużą ilością mikroorganizmów interferujących.

Próbki z dużą zawartością mikroorganizmów niezatężonych (bezpośrednio), zatężonych lub rozcieńczonych (1:10). Każdą próbkę należy podzielić na 3 części. Jedna część zostaje nie ruszona, druga poddana działaniu wysokiej temperatury, a trzecia działaniu kwasu. Posiać i rozetrzeć 0,1 ml do 0,5 ml każdej porcji podpróbki na jedną płytkę GVPC lub MWY. Należy zanotować posianą objętość.

Próbki z ekstremalnie wysoką ilością mikroorganizmów interferujących.

Próbki takie niezatężone i rozcieńczone (1:10 i 1:100) po wcześniejszym przygotowaniu z zastosowaniem temperatury i kwasu. Ważne jest, aby schłodzić próbkę potraktowaną wysoką temperaturą do temperatury pokojowej przed poddaniem próbki działaniu kwasu. Przygotować rozcieńczenia w sterylnym rozcieńczalniku bezpośrednio po potraktowaniu kwasem (według załącznika C).

Próbki należy dobrze wymieszać przez wytrząsanie stosując mieszadło typu vortex lub w łaźni ultradźwiękowej. W razie potrzeby należy dodać (tylko aby przykryć dno kontenera) sterylne kulki szklane do próbek, aby wspomóc dezagregację materiału. Posiać i rozetrzeć 0,1 ml do 0,5 ml każdej porcji na jedną płytkę GVPC lub jedną płytkę MWY. Należy zanotować posianą objętość.

Inkubacja

Płytki po posianiu należy zostawić do wchłonięcia pynu, potem należy próbki odwrócić i inkubować w temperaturze (36 ± 2) °C przez 7 do 10 dni. Ważne, aby podczas inkubacji wytworzyć odpowiednie warunki wilgotnościowe, a tym samym zapobiec przesuszeniu (odwodnieniu) płytek np. poprzez umieszczenie ich w kontenerze/tubusie z nasączoną tkaniną np. lignina.

UWAGA – dane z walidacji procesu uzyskane poprzez zaszczepienie sztuczne próbek nie wykazały różnic pomiędzy wzrostem drobnoustrojów podczas inkubacji 7 dni i po inkubacji 10 dni. Jednakże próbki naturalne zawierające dzikie szczepy *Legionella* mogą wymagać pełnych 10 dni inkubacji, aby wykazać wzrost.

Analiza płytek

Pierwsze oglądanie płytek powinno się odbyć albo na 2,3,4 lub piąty dzień, a ostateczny odczyt na koniec. Wykonuje się to po to, aby móc zidentyfikować przerost na płytce. Ostateczny wynik ilościowy można podać dopiero na koniec okresu inkubacji. Zakres dla oznaczenia ilościowego podaje tabela H.1. Chociaż *Legionella* rośnie powoli i jej wzrost może być przesłonięty przez inne mikroorganizmy dlatego też zaleca się zastosowanie mikroskopu ze światłem padającym ukośnie.

Należy zanotować liczbę wszystkich bakterii będących potencjalnymi *Legionella*.

Dla próbek, w których spodziewamy się wysokiej liczby mikroflory towarzyszącej pierwsze odczytanie płytek powinno nastąpić już po dwóch dniach, aby określić czy konieczne będą rozcieńczenia. Należy jednak mieć na uwadze potencjalnie negatywny wpływ konserwacji próbki lub koncentratu przez okres dwóch kolejnych dni.

Kolonie bakterii *Legionella* są białoszare zasadniczo ale czasem mogą mieć inny kolor. Są gładkie na całej powierzchni i mają charakterystyczny kryształowy wygląd. W świetle UV niektóre gatunki (*L. anisa*, *L. bozemanii*, *L. cherrii*, *L. dumoffii*, *L. gormanii*, *L. gratiana*, *L. parisiensis*, *L. steigerwaltii* i *L. tucsonensis*) autofluorescencyjnie olśniewająco białe. *L. erythra* i *L. rubrilucens* ma kolonie czerwone. *L. pneumophila* są matowo zielone i często z żółtym zabarwieniem. Fluorescencja pomaga rozróżnić kolonie w próbkach z dużą ilością różnych gatunków *Legionella*. Aby zabezpieczyć kolonie *Legionella* przed zabiciem lub uszkodzeniem, a tym samym przed niewykryciem, płytki nie powinny być wystawiane na działanie światła UV przez czas dłuższy niż to niezbędne.

Norma podaje, że nowe gatunki *Legionella* mogą wykazywać cechy charakterystyczne inne niż te opisane powyżej.

Potwierdzenie potencjalnych kolonii *Legionella* na agarze BCYE i BCYE z cysteiną.

Należy przesiać z płytki/płytek wykazujących największą liczbę potencjalnych *Legionella* w objętości wody. Gdy mamy tylko jeden rodzaj kolonii należy wybrać 3 z nich, a jeśli na płytce wyrosło więcej kolonii morfologicznie wskazujących na potencjalne *Legionella*, należy wybrać przynajmniej po jednej kolonii z każdego typu. Należy je przesiać na płytkę BCYE i płytkę BCYE z cysteiną (w załączniku B.2 opisane są pożywki alternatywne). Należy uważać aby z kolonią nie pobrać pożywki i najpierw wykonać przesiew na płytkę z BCYE z cysteiną a następnie na BCYE. Płytki należy inkubować w temperaturze (36 ± 2) °C przez 2 do 5 dni. Brać pod uwagę tylko te kolonie *Legionella*, które rosną na pożywce BCYE, a nie rosną na podłożu BCYE -cys (bez cysteiny). Należy zanotować wynik dla każdej płytki. Jeśli

CZEŚĆ IV

POPULARNE METODY USUWANIA BAKTERII *LEGIONELLA* Z INSTALACJI

Na statkach, gdzie gromadzona jest woda w zbiornikach. W budynkach, w których przebywa dużo ludzi jak hotele, pensjonaty powinna zostać przeprowadzona analiza ryzyka pod kątem zagrożenia bakteriami z rodzaju *Legionella*. Powinny zostać zidentyfikowane punkty kontrolne. Instalacje powinny podlegać przeglądom, a okresowo należałoby przeprowadzać dezynfekcję systemu. Wiele krajów opublikowało specjalne przewodniki mówiące o sposobach obniżenia ryzyka zakażenia bakteriami np. z wież chłodniczych. Dodatkowo podawane są informacje jak postępować podczas projektowania urządzeń oraz serwisu, aby zminimalizować ryzyko zakażenia. Takie przewodniki podają zazwyczaj również sposób postępowania w nagłych wypadkach, jeśli już dojdzie do zakażenia instalacji.

Zaleca się w nich kontrolę temperatury wody, przeglądy, kontrolne pobieranie próbek, przepłukiwanie instalacji aby zapobiegać zastoinom wodnym itp.

Techniki wykorzystywane do usuwania *Legionelli*:

- hiperchlorowanie (szokowe i ciągłe)
- szok termiczny
- dwutlenek chloru
- jonizacja z zastosowaniem miedzi i srebra
- nadtlenek wodoru i jony srebra
- promieniowanie ultrafioletowe.

Tabela 1: Wpływ temperatury wody na usuwanie bakterii *Legionella*:

Temperatura wody	Czas obumierania <i>Legionella</i>
55 °C	20 min.
57,5 °C	6 min.
60 °C	2 min.
70 °C	sekundy

Aby zapobiec zakażeniom, instalacje wodno-kanalizacyjne i klimatyzacyjne powinny być projektowane tak, by temperatura zimnej wody nie była wyższa niż 20 °C, a woda gorąca miała powyżej 55 °C. Należy izolować rury z zimną i ciepłą wodą, by zimna woda nie podgrzewała się do temperatur odpowiednich dla namnażania bakterii.