



DOMINIQUE DUTSCHER SAS

Legio

 EZ-Lab

NOTICE PROTOCOLE D'ANALYSE EZ-LAB

INSTRUCTIONS FOR USE

EZ-LAB ANALYSIS PROTOCOL

DOMINIQUE DUTSCHER SAS



NOTICE PROTOCOLE D'ANALYSE EZ-LAB

DOMINIQUE DEUTSCHER SAS

DOMINIQUE DUTSCHER SAS

Sommaire

1.

■ **Introduction** p.6 à 7

2.

■ **Materiel nécessaire pour réalisation de l'analyse Legio EZ-Lab** p.8 à 9

Appareillage et verrerie.....p.8

Consommables et solutions.....p.9

3.

■ **Le Kit Legio EZ-Lab** p.10

Composition du kit..... p.10

À réception du kit Legio EZ-Lab.....p.10

Préparation du kit Legio Ez-Lab avant 1ère utilisationp.11 à 12

4.

■ **Mode opératoire** p.12

Partie 1: Préparation de l'échantillon..... p.13 à 14

Incubation..... p.14

Partie 2 : Révélation..... p.14 à 16

5.

■ **Résultat** p.17

Fin de l'analyse, entretien de l'équipement.....p.18

• **IMPORTANT**



Utiliser ce kit uniquement pour des analyses environnementales d'Eaux Chaudes Sanitaires, Eaux Potables et Eaux de TAR.

Pour une assistance technique, merci de contacter le service support.

Introduction

Legio EZ-Lab de **C4Hydro** est une solution simple et rapide basée sur la technologie **Diamidex** qui permet de détecter exclusivement les bactéries *Legionella pneumophila* (*L. pneumophila*) cultivables (au même titre que la procédure réglementaire NF T90-431) de tous sérogroupes dans des échantillons d'Eaux Potables (EP), Eaux Chaudes Sanitaires (ECS) et Eaux de Tour aéroréfrigérantes (TAR).

Un kit permet de réaliser 96 analyses.

Legio EZ-Lab permet d'identifier en 48 heures les échantillons d'EP, d'ECS ou d'eaux de TAR contenant moins de 1 000 UFC/L de *L. pneumophila*, entre 1 000 et 100 000 UFC/L ou au-delà de 100 000 UFC/L.



Technologie utilisée

LA TECHNOLOGIE DIAMIDEX :

Cette solution utilise la technologie innovante brevetée **Diamidex** qui combine:

- (i) une mise en culture sur gélose sélective GVPC de l'échantillon à analyser,
- (ii) l'assimilation exclusivement par les *L. pneumophila* d'un sucre modifié,
- (iii) une révélation de ce sucre modifié présent après assimilation dans la partie O-antigénique du lipopolysaccharide des *L. pneumophila* vivantes, via une réaction permettant de réaliser une réaction colorimétrique enzymatique.



Recommandations pour une utilisation idéale :

Bien lire le protocole avant d'effectuer l'analyse. En cas de doute, contacter le service support des produits **C4Hydro** dont les coordonnées figurent au dos de la présente notice.

Le protocole est sans danger en conditions normales d'utilisation.

L'échantillon d'eau pouvant potentiellement contenir des *L. pneumophila*, il est recommandé de prendre les précautions d'usage tout au long de l'analyse.

Éviter tout contact des réactifs avec la peau et les yeux ainsi que les éclaboussures.

Stocker le kit de réactifs **Legio EZ-Lab** entre +4°C et +8°C.

Stocker **les Flacons S** du kit de réactifs **Legio EZ-Lab** à -20°C (avant resuspension).

DOMINIQUE DUSCHET SAS



Materiel nécessaire pour réalisation de l'analyse Legio EZ-Lab

Appareillage et verrerie :

Consommables (liste non exhaustive) et matériel courant de laboratoire de microbiologie et notamment :

- Appareils pour la stérilisation en chaleur sèche (four) ou en chaleur humide (autoclave).

À l'exclusion du matériel livré stérile, particulièrement celui en plastique, la verrerie doit être stérilisée :

- Soit au four, en la maintenant à une température de $(175 \pm 10)^{\circ}\text{C}$ pendant au moins 1 h ;
- Soit à l'autoclave, en la maintenant à une température de $(121 \pm 3)^{\circ}\text{C}$ pendant au moins 15 min.
- Étuve ou enceinte thermostatée, réglée à $(36 \pm 2)^{\circ}\text{C}$, assurant une bonne répartition thermique et une humidité suffisante.
- Rampe de filtration **C4Hydro** (Ref : 00 129)
- Pompe à filtration (Compatible avec la Rampe de filtration C4Hydro, voir Notice d'utilisation correspondante)
- Pinces stériles pour saisir les membranes sans les altérer
- pH-mètre.
- Appareils de filtration à usage unique de diamètre moyen de pores $0,2 \mu\text{m}$, soit complets, soit à monter sur seringue

- Incubateur 52°C ± 0,5°C
- Colorimètre **C4Hydro** (Ref : 00 332).
- Râteau d'ensemencement stérile.
- Cuve macro de spectrométrie avec bouchon (Ref. C4Hydro 634-1067 ou Cuve macro à usage unique, avec quatre côtés transparents, matière PS, gamme 340 – 900 nm, exemple Réf : VWR 634-1067 et son bouchon Réf : VWR RATI2812011).
- Minuteur.
- Espace de stockage réfrigéré (entre 4°C et 8°C)
- Espace de stockage réfrigéré (-20°C)

Consommables et solutions :

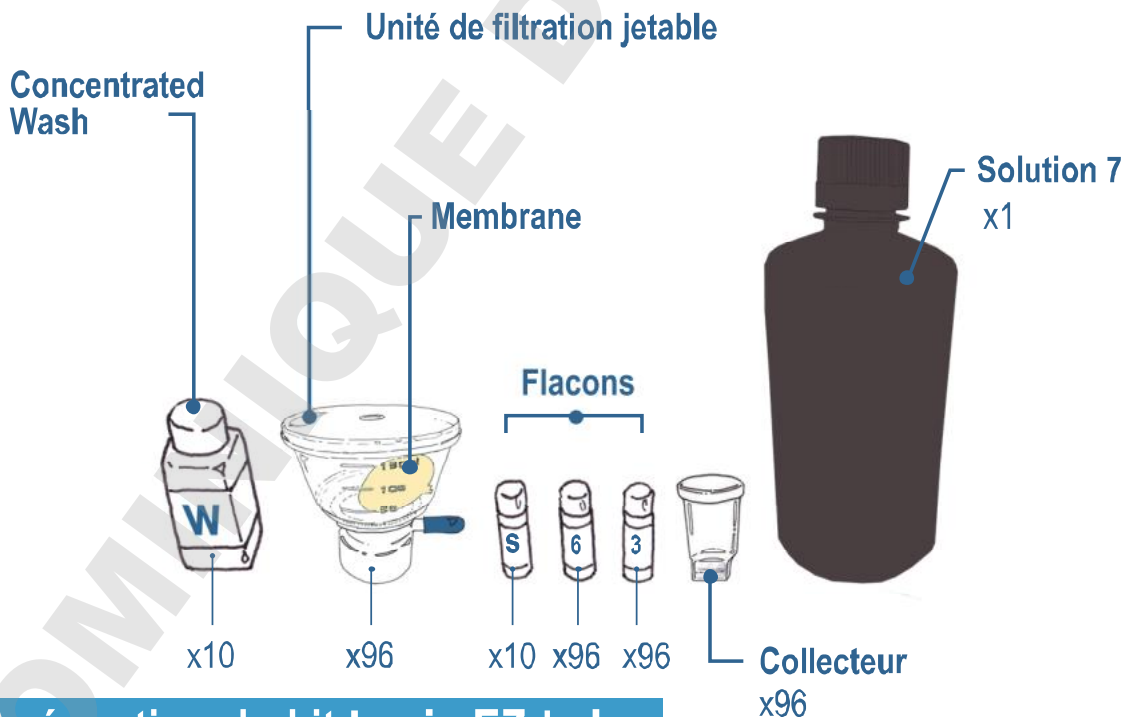
- Kit Legio EZ-Lab
- Solution 1, Tampon pH2 (voir p.11)
- Solution 2, H₂O purifiée stérile (voir p.11)
- Solution 4, Tampon pH1. (voir p.11)
- Solution 5, Ethanol 85% (voir p.11)
- Boîtes de gélose GVPC sélectives pour Legionella (Thermofisher Scientifics, Reference PO5074A). Il est **impératif** d'utiliser cette référence de boîte Gélosée sous peine de compromettre le résultat.
- Pipettes de différents volumes.

Le Kit Legio EZ-Lab

➔ Le kit Legio EZ-Lab vous permet de réaliser 96 analyses. ➔

Composition du kit :

- 96 flacons "3" unidoses (conservation 4°C)
- 10 petits flacons verre "S" (conservation -20°C à réception puis à 4°C après resuspension)
- 96 flacons "6" unidoses (conservation 4°C)
- 1 bouteille opaque de **Solution "7"** de 1 000 ml contenant 530 ml (conservation 4°C)
- 10 bouteilles « **Concentrated Wash** » de 100 ml (conservation 4°C)
- 96 **Unités de filtration jetables** sous sachet stérile contenant une membrane de filtration.
- 96 tubes collecteurs avec bouchon



A réception du kit Legio EZ-Lab :

Placer les flacons 3, 6, 7 et « Concentrated Wash » entre 4 et 8°C.

Avant resuspension, les **Flacons "S"** doivent être conservés à une température de -20°C.

Préparation du kit Legio EZ-Lab avant 1ère utilisation :

- Préparation des Solutions permettant de réaliser 96 analyses

Solution 1 : Tampon pH 2,0 +/- 0,2

Pour 500 ml :

HCl 0,2 mol/L	26,3 ml
KCl 0,2 mol/L	473,7 ml

Ce tampon peut être conservé pendant 3 mois à l'obscurité s'il est stérilisé par filtration sur filtre 0,2 µm ou par autoclavage à (121 +/- 3) °C. Vérifier le pH et la **stérilité avant utilisation**.

Solution 2 : H₂O stérile purifiée

Solution 4 : Tampon pH 1,0 +/- 0,2

HCl 0,2 mol/L	79,5 ml
KCl 0,2 mol/L	172,35 ml
H ₂ O	66,15 ml

Vérifier le pH.

Cette solution pH1 servira à resuspendre **les Flacon S** (voir **Solution B** ci-dessous).

Solution B

Resuspendre **un Flacon S** avec 3 ml de **Solution 4** (tampon pH1) puis transvaser ces 3 ml dans une bouteille contenant 30 ml de **Solution 4** (tampon pH1). La **Solution B** ainsi obtenue est la quantité nécessaire pour l'analyse de 10 échantillons.

Ne pas utiliser cette solution dans l'heure qui suit sa préparation. Nous vous conseillons de **préparer la solution en J1** lors de la 1ère partie du protocole et de **l'utiliser en J3** lors de la 2ème partie du protocole.

Cette solution est à conserver à 4°C à l'abri de la lumière et pour une durée maximum de 3 mois.

Solution 5 : Ethanol 85%

Pour 500 ml (5 ml de cette solution seront utilisés par échantillon analysé):

Ethanol 99%	425 ml
H ₂ O	75 ml

Cette solution peut être conservée pendant 3 mois.

Solution de Rinçage

Diluer stérilement la solution contenue dans un flacon « Concentrated Wash » dans une bouteille stérile contenant 900 ml d'H₂O stérile. La solution de rinçage ainsi obtenue est la quantité nécessaire pour l'analyse de 10 échantillons.

Cette solution doit être conservée stérile et à 4°C, en cas de doute sur la stérilité de la solution, celle-ci peut être refiltrée sur filtres 0,22µm (carafe filtrante ou en filtre seringue selon le volume).



ATTENTION

Certaines eaux peuvent présenter une coloration, des particules visibles en suspension ou un volume filtrable inférieur à 25 ml, dans ce cas nous vous conseillons de réaliser une préfiltration de votre échantillon sur des filtres 10µm.

Mode opératoire



ATTENTION

L'ensemble des temps d'attente doivent être respectés scrupuleusement afin de garantir le résultat de l'analyse.

Dans la suite du protocole le terme « filtrer » sera associé aux manipulations suivantes :

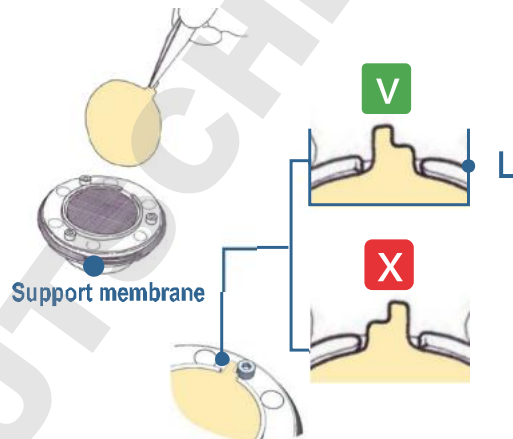
- Mettre en marche la pompe à vide pendant 40s
- Casser le vide en ouvrant la vanne rouge présente sur la rampe de filtration **C4Hydro**
- Arrêter la pompe
- Une fois la pompe éteinte, attendre 10 secondes de plus avant de passer à l'étape suivante.

En effet, vous devez être certain que l'aspiration est bien terminée avant de verser un autre réactif. Si l'aspiration n'est pas complètement terminée, le réactif suivant pourrait être aspiré avant d'avoir pu agir.

Partie 1 : Préparation de l'échantillon

- Prendre le Support membrane et l'Entonnoir aimanté fournis avec la Rampe de filtration **C4Hydro**.
- Positionner le Support membrane sur la rampe de filtration.
- Resuspendre un **Flacon 3 pour chaque échantillon analysé** avec 500 µl d'H₂O stérile. **Conserver ce flacon pour la suite de l'analyse.**
- Ouvrir les Unités de filtrations jetables et les sortir de leur emballage plastique.

- A l'aide d'une pince, prendre la membrane se trouvant à l'intérieur de l'Unité de filtration jetable par sa languette et la déposer sur le Support membrane.

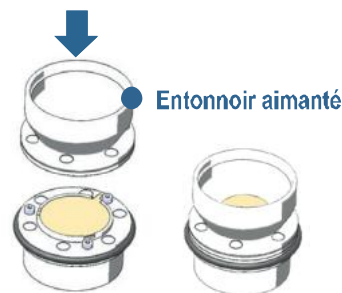


- Faire attention au sens de dépôt de la membrane, la languette doit former un "L".

- Remettre son couvercle sur l'Unité de filtration jetable, et la ranger dans son sachet.

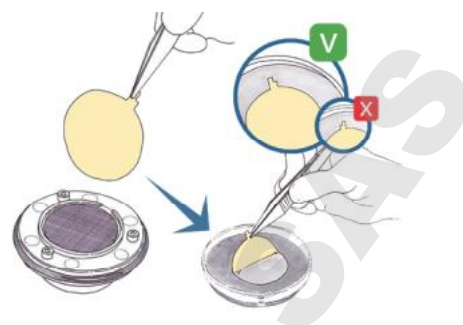
NB : Cette partie ne nécessitera pas l'usage de l'Unité de filtration jetable, seulement de la membrane se situant à l'intérieur. **Les Unités de filtrations jetables seront à conserver pour la partie 2 du protocole, après incubation.**

- Positionner l'Entonnoir aimanté sur le Support membrane en veillant à ce que les aimants de l'Entonnoir et du Support membrane s'enclenchent correctement.



- Filtrer 25 ml d'échantillon à analyser puis stopper l'aspiration.
- Ajouter 5 ml de **Solution 1** et laisser incuber 5 min.
- Filtrer 40s et attendre 10s.
- Déposer 10 ml de **Solution 2**.
- Filtrer 40s et attendre 10s.
- Déposer la totalité du **Flacon 3** au centre de la boîte de Pétri gélosée GVPC (GVPC sélectives pour Legionella Thermofisher Scientifics, Reference PO5074A).

- Soulever l'Entonnoir aimanté et prendre la membrane à l'aide d'une pince stérile.
- Déposer la membrane à l'endroit, toujours avec la languette formant un "L", sur la goutte de milieu. S'assurer qu'il n'y ait pas de bulles d'air entre la membrane et la gélose.



Incubation

Pour l'analyse des Eaux Chaudes Sanitaires et Eaux Potables :

- Retourner les boîtes ainsi préparées et les placer dans l'enceinte thermostatée à $(36 \pm 2) ^\circ\text{C}$ durant **47h**.

Pour l'analyse des Eaux de Tours Aéroréfrigérantes :

- Retourner les boîtes ainsi préparées et les placer dans l'enceinte thermostatée à 52°C ($\pm 0,5^\circ\text{C}$) durant **45min** puis les mettre dans l'enceinte thermostatée à $(36 \pm 2) ^\circ\text{C}$ durant **47h**.

Partie 2 : Révélation

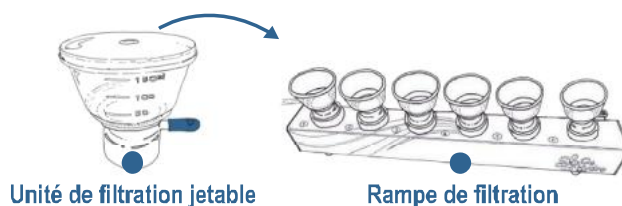
Après 47h d'incubation :

- Placer les composants suivants du kit **Legio EZ-Lab** à température ambiante :
(X étant le nombre d'analyse à effectuer, prévoir) :
 - X * 75 ml de **Solution de Rinçage**.
(Attention : préalablement diluée au 10e dans de l'eau stérile, Cf «preparation du kit Legio EZ-Lab avant 1ere utilisation»)
 - X * 3ml de **Solution B**.
 - X * **Flacon 6** unidose.
 - X * 5ml de **Solution 7**.

➡ (Il est important que cette solution soit à température ambiante lors de son utilisation). ⬅

Reprise de l'analyse :

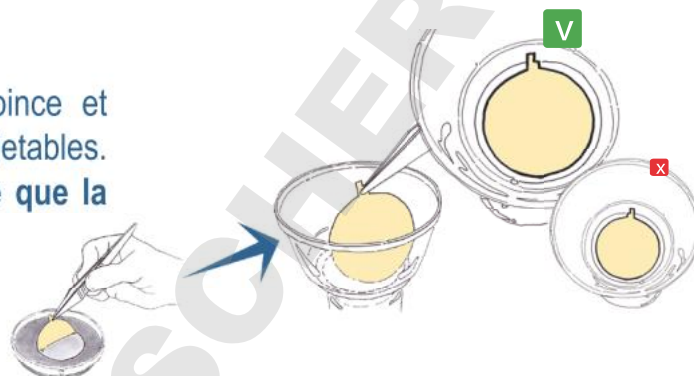
- Prendre les Unités de filtration jetables et les disposer sur la rampe de filtration **C4Hydro**.
- Resuspendre un **Flacon 6** pour chaque échantillon analysé avec 5 ml de Solution de Rinçage.



Conserver ce flacon pour la suite de l'analyse.

- Sortir les boîtes de pétri de l'incubateur.
 - Observer les membranes :
- ➔ Ace stade, et dans la plupart des cas, la membrane comportera peu (ou pas) d'éléments visibles à l'œil. Si vous remarquez de nombreuses colonies sur la membrane, cela pourra indiquer que votre échantillon d'eau était très chargé en microorganismes, et empêcher le fonctionnement de la prochaine filtration. **Si la filtration suivante ne fonctionne pas, veuillez-vous reporter aux exemples présentés à la fin de cette notice.**

- Prendre les membranes à l'aide d'une pince et les disposer dans les unités de filtration jetables. **Attention à bien les centrer, veillez à ce que la languette forme un "L".**



- Déposer 10 ml de **Solution de Rinçage**.
- Gratter la membrane 30s à l'aide d'un râteau d'ensemencement stérile.
- Filtrer 40s et attendre 10s.
- Déposer 10 ml de **Solution de Rinçage**.
- Filtrer 40s et attendre 10s.
- Déposer 3 ml de la **Solution B** et **incuber 5 min.**
- Filtrer 40s et attendre 10s.
- Déposer 10 ml de **Solution de Rinçage**.
- Filtrer 40s et attendre 10s.
- Déposer 5 ml de la **Solution 5** et **patienter 1 min.**
- Filtrer 40s et attendre 10s.
- Déposer 10 ml de **Solution de Rinçage**.
- Filtrer 40s et attendre 10s.
- Vérifier la complète dissolution du **Flacon 6** et déposer son contenu au centre de l'unité de filtration. **Patience 30min.**
- Filtrer 40s et attendre 10s
- Déposer 10 ml de **Solution Rinçage**.
- Filtrer 40s et attendre 10s.

- Déposer 10 ml de **Solution de Rinçage**.
- Filtrer 40s et attendre 10s.
- Déposer 10 ml de **Solution 2**.
- Filtrer 40s et attendre 10s.
- Retirer l'Unité de filtration jetable de la Rampe de filtration et placer un **tube collecteur** dans l'emplacement de la Rampe de filtration.
- Repositionner l'Unité de filtration jetable sur la rampe.
- Déposer 5ml de la **Solution 7. Patienter 5 min**.
- Filtrer 40s et attendre 10s
- Récupérer le **tube collecteur** sous les Unités de filtration jetables et **patienter 5 min**.
- Pendant ces 5 min, transférer au minimum 2 ml de la solution se trouvant dans le collecteur dans une **cuve macro de spectrométrie**.
- Assurez-vous que le colorimètre est correctement calibré en insérant une cuve remplie d'eau et en appuyant sur Cal.
- Après les 5 min, placer la cuve avec l'échantillon dans le colorimètre.
- Lire la densité optique.

Résultat

- Si le résultat est **inférieur à 0,24** l'échantillon initial comporte **moins de 1 000 *Legionella pneumophila* par L.**
< 1 000 UFC/L de *Legionella pneumophila*
- Si le résultat est **compris entre 0,24 et 0,6** l'échantillon initial comporte **entre 1 000 et 100 000 *Legionella pneumophila* par L.**
De 1 000 UFC/L à 100 000 UFC/L de *Legionella pneumophila*
- Si le résultat est **supérieur à 0,6** l'échantillon initial comporte **plus de 100 000 *Legionella pneumophila* par L.**
>100 000 UFC/L de *Legionella pneumophila*

FIN DE L'ANALYSE, ENTRETIEN DE L'EQUIPEMENT

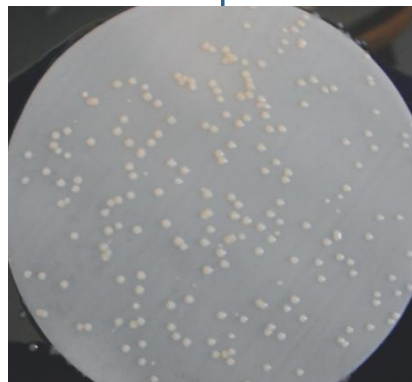
- Une fois l'analyse terminée, éliminer les déchets conformément aux bonnes pratiques de votre établissement.
- Déposer 2ml de solution 5 (Éthanol 85%) sur les boîtes de gélose GVPC puis étaler avec le râteau utilisé.
- Nettoyer les équipements conformément aux préconisations d'entretien détaillées dans les notices d'utilisation fournies avec chacun d'entre eux.

• IMPORTANT

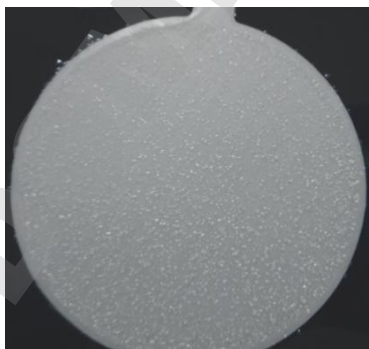


Aucun liquide ne doit rester à l'intérieur des équipements. Les Supports membrane et Entonnoirs aimantés doivent être rincés abondamment et séchés.

Cas de colmatage de la membrane après incubation :



Présence d'une flore interférente trop importante pour interpréter la concentration en *Legionella pneumophila* de votre échantillon. Dans ce type de cas, la plupart des méthodes de détection et dénombrement de *Legionella pneumophila* donneront des résultats non interprétables.



! ATTENTION

Votre échantillon comporte très probablement une quantité très importante de *Legionella pneumophila* ($> 100\ 000$ UFC/L).

Veillez à déposer 5ml de Solution 5 pour décontaminer votre membrane.



DOMINIQUE DUTSCHER SAS

Legio



EZ-Lab

**INSTRUCTIONS FOR USE
ANALYSIS PROTOCOL**

DOMINIQUE FRIEDRICH SCHER SAS

Summary

1.

■ **Introduction** p.22 à 23

2.

■ **Materials required for Legio EZ-Lab analysis** p.24

Apparatus and glassware.....p.24 to 25

Consumables and solutions.....p.25

3.

■ **The Legio EZ-Lab Kit** p.26

Composition of the Kit..... p.26

Upon receipt of the Legio EZ-Lab Kit.....p.26

Preparation of the Legio Ez-Lab Kit before first use..... p.27 to 28

4.

■ **Operating mode** p.28

Part 1 : Sample preparation..... p.29 to 30

Incubation..... p.30

Part 2 : Revelation p.30 à 32

5.

■ **Result** p.32

End of analysis, maintenance of the equipment..... p.33

• **IMPORTANT**



Use this kit only for environmental analyzes of Sanitary Hot Waters, Drinking Waters and Cooling Tower Waters.

For technical assistance - Please contact our technical support.

Introduction

C4Hydro Legio EZ-Lab is a quick and easy solution based on **Diamidex** technology that can detect exclusively cultivable *Legionella pneumophila* (*L. pneumophila*) bacteria (as well as the regulatory procedure NF T90-431) of all serogroups in samples of Drinking Water (DW), Sanitary Hot Water (SHW) and Cooling Towers Water (CTW).

A kit allows to carry out 96 analyzes.

Legio EZ-Lab allows to identify in **48 hours** samples of DW, SHW or CTW containing less than 1,000 CFU/L of *L. pneumophila*, between 1,000 and 100,000 CFU/L or beyond 100,000 CFU / L.



Technology used

DIAMIDEX TECHNOLOGY:

This solution uses the patented innovative **Diamidex** technology that combines:

- (i) culturing on selective agar GVPC of the sample to be analysed,
- (ii) assimilation only by the *L. pneumophila* of a modified sugar,
- (iii) revelation of this modified sugar present after the assimilation in the part O- antigenic of lipopolysaccharide of *L. pneumophila*, through a reaction based on «click» chemistry for realizing colorimetric and enzymic reaction.



Recommendations for an optimal use :

Read the protocol carefully before performing the analysis. If in doubt, contact the **C4Hydro** product support department, which contact details appear on the back of this manual.

— The protocol is safe under normal conditions of use.

— As the water sample may potentially contain *L. pneumophila*, it is recommended that the usual precautions be taken throughout the analysis.

— Avoid splashes and contact of reagents with skin and eyes.

— Store the **Legio EZ-Lab** Reagent Kit at + 4 ° C to + 8 ° C.

— Store **Vials S** contained in the **Legio EZ-Lab** reagent kit at -20 ° C (before resuspension).

Materials required for Legio EZ-Lab analysis :

Apparatus and glassware:

Consumables (non-exhaustive list) and standard equipment of microbiology laboratory and in particular :

- Apparatus for sterilization in dry heat (oven) or moist heat (autoclave).

Excluding the sterile delivered material, especially the plastic one, the glassware must be sterilized :

- In the oven, maintaining it at a temperature of $(175 \pm 10)^{\circ}\text{C}$ for at least 1 hour;
 - Or by autoclaving, maintaining it at a temperature of $(121 \pm 3)^{\circ}\text{C}$ for at least 15 min.
- Oven or thermostatically controlled chamber, set at $(36 \pm 2)^{\circ}\text{C}$, ensuring good thermal distribution and sufficient humidity.
 - **C4Hydro** Filtration Manifold (*Ref : 00 129*)
 - Filtration pump (Compatible with the C4Hydro Filtration Manifold, see corresponding operating instructions)
 - Sterile forceps to grasp membranes without altering them.
 - pH meter.
 - Single-use filtration devices with an average pore diameter of $0.2 \mu\text{m}$, either complete or to be mounted on a syringe.
 - Incubator $52^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$

- **C4Hydro** Colorimeter (Ref : 00 332).
- Sterile seeding rake.
- Macro Spectrometric Cuvette with Cap (Ref.C4Hydro 634-1067 or Single use Macro Vessel, with four transparent sides, PS material, range 340 - 900 nm, example Ref: VWR 634-1067 and cap Ref: VWR RAT12812011).
- Timer.
- Refrigerated storage space (between 4 ° C and 8 ° C)
- Refrigerated storage space (-20°C)

Consumables and solutions:

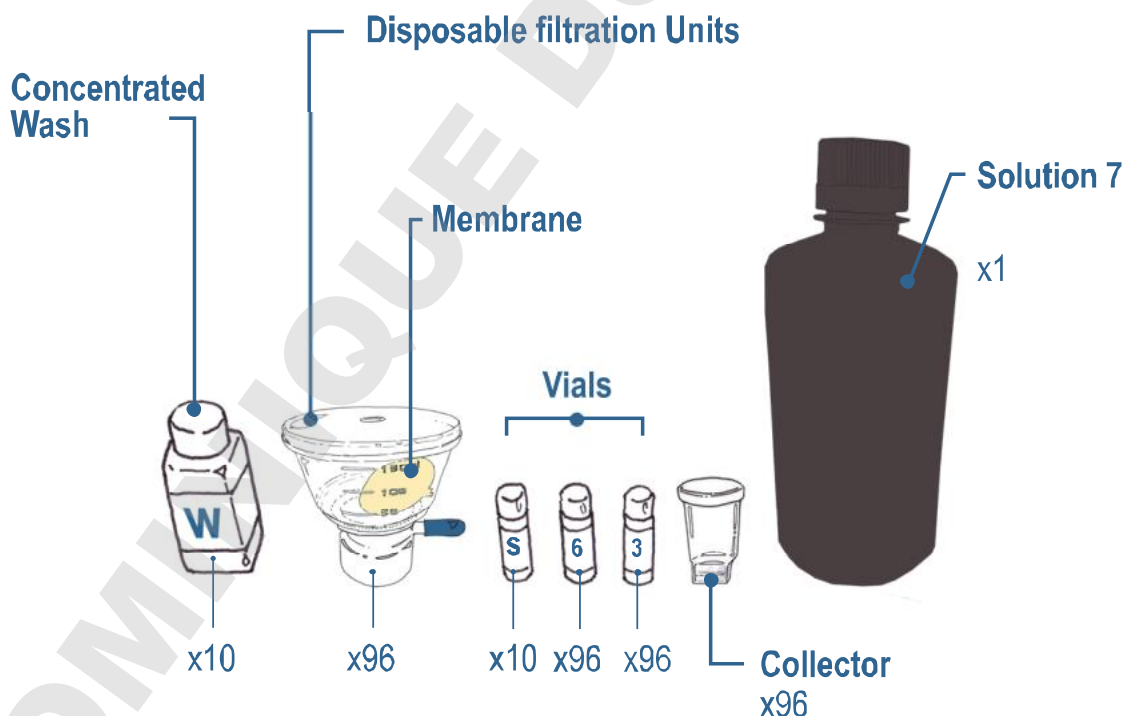
- Legio EZ-Lab Kit
- Solution 1, Buffer pH2 (see p.27)
- Solution 2, purified sterile H₂O
- Solution 4, Buffer pH1 (see p.27)
- Solution 5, Ethanol 85% (see p.27)
- Selective GVPC agar plates for Legionella (Thermofisher Scientifics, Reference PO5074A). It is imperative to use this agar box reference under penalty of compromising the result.
- Pipettes of different volumes.

The Legio EZ-Lab Kit

➔ The Legio EZ-Lab kit allows you to perform 96 analyzes. ➔

Composition of the kit :

- 96 single dose **vials «3»** (storage at 4°C)
- 10 small glass **vials «S»** (storage at -20°C on reception then 4°C after resuspension)
- 96 single-dose **vials «6»** (storage at 4°C)
- **1 opaque bottle of Solution «7»** of 1000 ml containing 530 ml (storage at 4°C)
- 10 bottles of 100ml **«Concentrated Wash»** (storage at 4°C)
- 96 **Disposable filtration units** (in sterile bags) containing a filtration membrane.
- 96 **collectors** with caps



Upon receipt of the Legio EZ-Lab kit :

Place Vials **3**, **6**, **7** and «Concentrated Wash» at 4 to 8 ° C.
Before resuspension, **Vials «S»** must be kept at a temperature of -20 ° C.

Preparation of the Legio EZ-Lab kit before first use :

- Preparation of Solutions to perform 96 analyzes

Solution 1 : Buffer pH 2.0 +/- 0.2

For 500 ml :

HCl 0,2 mol/L	26,3 ml
KCl 0,2 mol/L	473,7 ml

This buffer can be stored for 3 months in the dark if it is sterilized by filtration on a 0.2 µm filter or by autoclaving at (121 +/- 3) ° C. **Check pH and sterility before use.**

Solution 2 : Purified sterile H₂O

Solution 4 : Buffer pH 1.0 +/- 0.2

HCl 0.2 mol / L	79.5 ml
KCl 0.2 mol / L	172.35 ml
H ₂ O	66.15 ml

Check the pH.

This buffer pH1 will be used to resuspend **Vials S** (see **Solution B** below).

Solution B

Resuspend **one Vial S** with 3 ml of Solution 4 (buffer pH1) and then transfer these 3 ml into a bottle containing 30 ml of Solution 4 (buffer pH1). The **B Solution** thus obtained is the quantity necessary for analysing 10 samples.

Do not use this solution within one hour of preparation. We advise you to prepare **the solution on D1** during the 1st part of the protocol and to **use it on D3** during the 2nd part of the protocol.

This solution should be stored at 4 ° C protected from light and for a maximum of 3 months.

Solution 5 : Ethanol solution 85%

For 500 ml (5 ml of this solution will be used for each sample analyzed) :

Ethanol 99%	425 ml
H ₂ O	75 ml

This solution can be kept for 3 months.

Rinsing Solution

Sterilely dilute the solution contained in one «Concentrated Wash» vial in a sterile bottle containing 900 ml of sterile H₂O. The Rinsing Solution thus obtained is the quantity necessary for analysing 10 samples.

This solution must be kept sterile and at 4°C, in case of doubt about the sterility of the solution, it can be re-filtered on 0.22µm filters (filter jug or syringe filter depending on the volume).



CAUTION

Some waters may be coloured, contain visible particles in suspension or have a filterable volume inferior to 25 ml. In this case we advise you to pre-filter your sample on 10µm filters.

Operating mode :



CAUTION

All waiting times must be strictly observed in order to guarantee the result of the analysis.

In the following protocol, the term «filter» will be associated with the following manipulations:

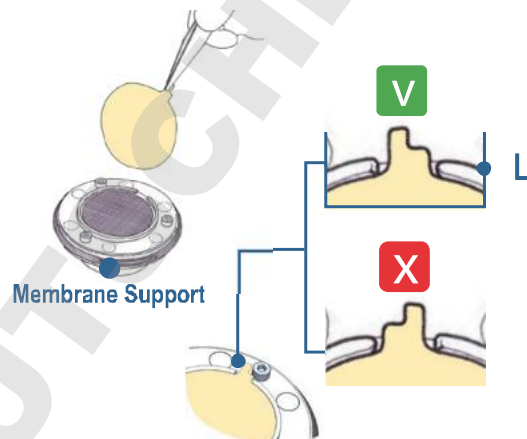
- Start the vacuum pump for 40s
- Break the vacuum by opening the red valve present on the **C4Hydro** Filtration Manifold
- Stop the pump
- Once the pump is off, wait another 10 seconds before proceeding to the next step.

Indeed, you must be certain that the aspiration is complete before pouring another reagent. If the aspiration is not complete, the next reagent may be aspirated before it can take effect.

Part 1 : Sample preparation

- Take the **membrane Support** and the magnetized Funnel provided with the **C4Hydro** Filtration Manifold.
- Position the membrane Support on the Filtration Manifold.
- Resuspend a **Vial 3** for each sample analyzed with 500 µl of sterile H₂O.
Keep this Vial for later in the analysis.
- Open **the disposable Filtration Units** and remove them from their plastic bag.

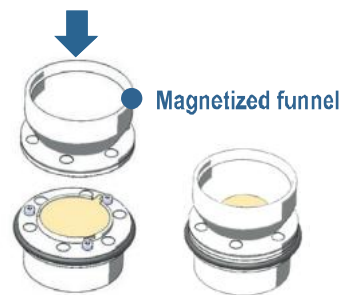
- Using a pair of forceps, take the membrane inside the disposable Filtration Unit by its tab and place it on the **membrane Support**.
- Pay attention to the direction of deposition of the membrane, the tab must form an "L".



- Put the cap back on the disposable Filtration Unit and store it in its bag.

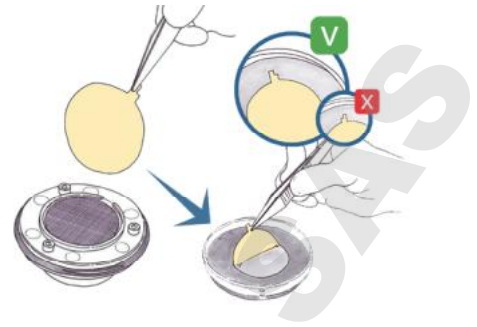
NB : This part will not require the use of the disposable filtration Unit, only the membrane located inside. Disposable filtration Units will be retained for Part 2 of the protocol after incubation.

- Position the **magnetized funnel** on the **membrane Support**, ensuring that the magnets of the Funnel and membrane Support engage correctly.



- Filter 25 ml of the sample to be analyzed and stop aspiration.
- Add 5 ml of **Solution 1** and incubate for 5 min.
- Filter 40s and wait 10s.
- Add 10 ml of **Solution 2**.
- Filter 40s and wait 10s.
- Place the whole of **Vial 3** in the center of the GVPC Petri dish (GVPC selective for Legionella Thermofisher Scientifics, Reference PO5074A).

- Lift the magnetized Funnel and take the membrane with a sterile forceps.
- With its tab still forming an "L", place the membrane on the drop standing at the center of the culture medium. Make sure there are no air bubbles between the membrane and the agar.



Incubation

For the analyzes of Sanitary Hot Waters and Drinking Waters :

Turn the Petri dishes upside down and place them in the thermostated chamber at $(36 \pm 2)^\circ\text{C}$ for **47 hours**.

For the analyzes of Cooling Towers Waters :

Turn the Petri dishes upside down and place them in the thermostatically controlled chamber at 52°C ($\pm 0.5^\circ\text{C}$) for **45 minutes**, and then put them in the thermostated chamber at $(36 \pm 2)^\circ\text{C}$ for **47 hours**.

Part 2 : Revelation

After 47hours of incubation :

- Place the following **Legio EZ-Lab** kit components at room temperature :

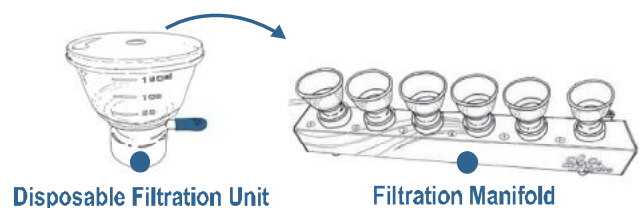
(X being the number of analysis to perform) :

- X * 75ml of **Rinsing Solution**.
(Attention : to be diluted to the 10th in sterile water, cf « preparation of the Legio EZ-Lab kit before first use »)
- X * 3ml of **Solution B**.
- X single-dose **Vials 6**.
- X * 5ml of **Solution 7**.

➡ (It is important for this solution to be at room temperature when being used). ⬅

Resumption of the analysis :

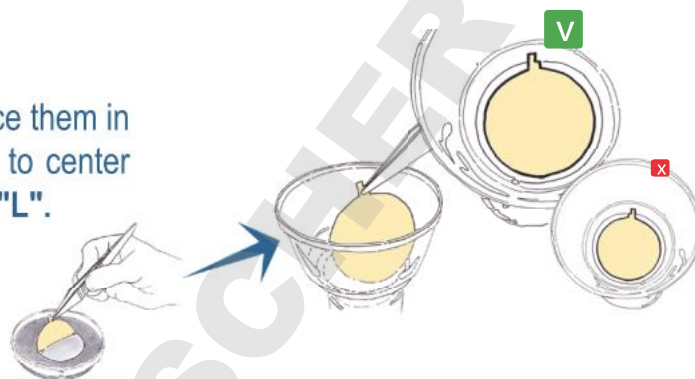
- Take the disposable Filtration Units and place them on the **C4Hydro** Filtration Manifold.



- Resuspend one **Vial 6** for each sample analyzed with 5 ml of **Rinsing Solution**.
Keep this vial for the rest of the analysis.

- Remove the Petri dishes from the incubator.
 - Observe the membranes :
- ➔ At this stage, and in most cases, the membrane will have few (or no) visible elements to the eye. If you notice many colonies on the membrane, this may indicate that your water sample was heavily loaded with microorganisms, and prevent the next filtration from working. If the following filtration does not work, please refer to the examples at the end of this leaflet.

- Take the membranes with forceps and place them in the disposable Filtration Units. Be careful to center them, and keep the tab in the shape of an "L".



- Pour 10 ml of **Rinsing Solution**.
- Scrub the membrane for 30s using a sterile seeding rake.
- Filter 40s and wait 10s.
- Pour 10 ml of **Rinsing Solution**.
- Filter 40s and wait 10s.
- Pour 3 ml of **Solution B** and **incubate for 5 min**.
- Filter 40s and wait 10s.
- Pour 10 ml of **Rinsing Solution**.
- Filter 40s and wait 10s.
- Add 5 ml of **Solution 5** and **wait 1 min**.
- Filter 40s and wait 10s.
- Pour 10 ml of **Rinsing Solution**.
- Filter 40s and wait 10s.
- Check the complete dissolution of **Vial 6** and pour its content in the center of the Filtration Unit. **Wait 30min**.
- Filter 40s and wait 10s.
- Pour 10 ml of **Rinsing Solution**.
- Filter 40s and wait 10s.

- Pour 10 ml of **Rinsing Solution**.
- Filter 40s and wait 10s.
- Pour 10 ml of **Solution 2**.
- Filter 40s and wait 10s.
- Remove the disposable Filtration Unit from the Filtration Manifold and place a **collector** in the location of the Filtration Manifold.
- Reposition the disposable Filtration Unit on the Filtration Manifold.
- Add 5ml of **Solution 7**. Wait 5 min.
- Filter 40s and wait 10s.
- Collect **the collector** from under the disposable Filtration Units and **wait 5 minutes**.
- During these 5 min, transfer **a minimum of 2 ml** of the solution contained in the collector tube into a **macro spectrometric cuvette**.
- Make sure the colorimeter is properly calibrated by inserting a cuvette filled with water and pressing Cal.
- After 5 min, place the cuvette containing the sample in the colorimeter.
- Read the optical density.

Result

- If the result is **less than 0.24**, then the initial sample contains **less than 1,000 *Legionella pneumophila* per L**.
< 1,000 CFU/L of *Legionella pneumophila*
- If the result is **between 0.24 and 0.6**, then the initial sample contains **between 1,000 and 100,000 *Legionella pneumophila* per L**.
From 1,000 CFU/L to 100,000 CFU/L of *Legionella pneumophila*
- If the result is **greater than 0.6**, the initial sample contains **more than 100,000 *Legionella pneumophila* per L**.
> 100,000 CFU/L of *Legionella pneumophila*

END OF ANALYSIS, MAINTENANCE OF THE EQUIPMENT

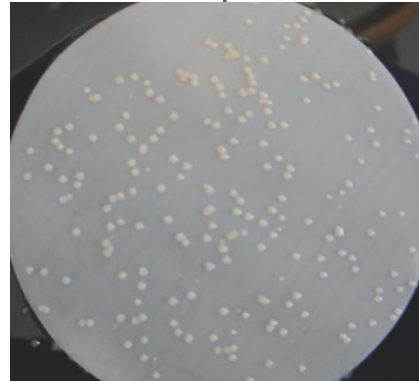
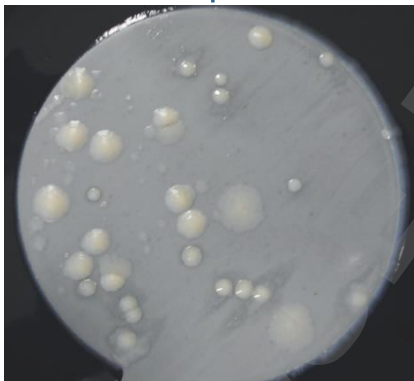
- Once the analysis is complete, dispose of the waste according to the best practices of your institution.
- Pour 2ml of solution 5 (Ethanol 85%) into the GVPC agar plates and spread with the rake previously used.
- Clean the equipment in accordance with the maintenance recommendations detailed in the instructions for use supplied with any one of them.

• IMPORTANT

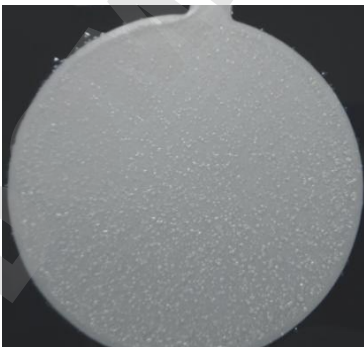


No liquid should remain inside the equipment, the membrane Supports and magnetized Funnels must be rinsed thoroughly and dried.

Case examples of membrane clogging after incubation:



Presence of an interfering flora too important to interpret the concentration of *Legionella pneumophila* in your sample. In this type of case, most methods of detection and enumeration of *Legionella pneumophila* will give uninterpretable results.



CAUTION

Your sample most likely contains a very large amount of *Legionella pneumophila* (> 100 000 CFU/L).

Make sure to pour 5ml of Solution 5 to decontaminate your membrane.

DOMINIQUE DUTSCHER SAS

DOMINIQUE DUTSCHER SAS

Ref : 00 413-E

Protocole d'Analyse Legio EZ-Lab | Analysis Protocol Legio EZ-Lab

© **Diamidex 2019**



DOMINIQUE DUTSCHER SAS

