



Verteiler: 2x Arbeitsplatz Mikrobiologie: Raum 12 u. Raum 13 (Technikum oben)

Anlagen: Vorlagen: Legionellennachweis\_TW und Legionellennachweis\_RKW

Verantwortlicher Mitarbeiter und Vertretung für den Arbeitsplatz festgelegt in der „Zuordnung zu den Prüfplätzen“, MH Teil 2

#### Grundlagen des Verfahrens:

ISO 11731 (2017-05) Water quality - Detection and enumeration of Legionella

UBA-Empfehlung vom 18.12.2018 „Systemische Untersuchungen von Trinkwasser-Installationen auf Legionellen nach Trinkwasserverordnung - Probenahme, Untersuchungsgang und Angabe des Ergebnisses“

UBA-Empfehlung vom 09.12.2022 „Systemische Untersuchungen von Trinkwasserinstallationen auf Legionellen nach Trinkwasserverordnung - Probenahme, Untersuchungsgang und Angabe des Ergebnisses“

TrinkwV vom 23.06.2023

DIN EN ISO 11731 (2019-03) Wasserbeschaffenheit - Zählung von Legionellen

VDI 2047 Blatt 2 (2019-01) Rückkühlwerke - Sicherstellung des hygienegerechten Betriebs von Verdunstungskühlanlagen (VDI-Kühlturmregeln)

UBA-Empfehlung vom 06.03.2020 Empfehlung des Umweltbundesamtes zur Probenahme und zum Nachweis von Legionellen in Verdunstungskühlanlagen, Kühltürmen und Nassabscheidern

Legionella Latex Test der Fa. OXOID (2016-05) Agglutinationstest

[DIN 19643-1 \(2023-06\) Aufbereitung von Schwimm- und Badebeckenwasser, Teil 1: Allgemeine Anforderungen](#)

Erstellt:	Geprüft:	Freigegeben:
S. Gey	Kathleen Lehmann	Kathleen Lehmann
Datum: 16.04.2024	Datum: 17.04.2024	Datum: 17.04.2024



## Liste der bisherigen Änderungen:

Nr.	Datum	Art der Änderung	Bestätigung
1	12.10.2007	Modifizierung und Ergänzung (Agglutinationstest)	U. Hornig
2	26.04.2011	Messunsicherheit ergänzt	U. Hornig
3	1.12.2011	Integration der DIN EN ISO 11731-2 (K22) 2008-06 in das Verfahren (Forderungen TrinkwV2001(2011))	U. Hornig
4	15.02.2012	Information des DVGW twin Nr. 06 vom November 2011 „Durchführung der Probenahme zur Untersuchung des Trinkwassers auf Legionellen“ (als Anlage 2 zur AA ergänzt)	K. Lehmann
5	April 2015	Bebrütungsdauer auf generell 10 Tage	U. Hornig
6	13.12.2016	Integration von Teilen des Normentwurfs DIN EN ISO 11731 zur besonderen Behandlung von Wässern aus Rückkühlwerken, Kühltürmen, Verdunstungsanlagen. Anlagen gestrichen; Formblatt nun im Vorlagenordner.	K. Lehmann
7	11.10.2017	UBA-Empfehlung vom 2.6.17 zur Probenahme und zum Nachweis von Legionellen in Verdunstungskühlanlagen, Kühltürmen und Nassabscheidern berücksichtigt	A. Ohlig
8	15.01.2018	ISO 11731 in Fassung von 2017 integriert	K. Lehmann
9	25.01.2018	Latex Test der Fa. OXOID konkretisiert, Messunsicherheit bei Legionellen angepasst	A. Ohlig
10	13.02.2018	Redaktionelle Änderungen	K. Lehmann
11	22.03.2018	Vereinheitlichung Begriffe Hitze- und Wärmebehandlung, neue DIN EN ISO 11731 (2018-03), Konkretisierungen	K. Lehmann
12	31.05.2018	Ergänzungen zum Vorgehen bei Ausbruchsfällen	S. Gey
13	11.01.2019	Neue UBA-Empfehlung zu Legionellen nach TrinkwV ergänzt	K. Lehmann
14	27.02.2019	Praktische Umsetzung UBA-Empfehlung festgelegt	S. Gey
15	19.03.2019	Anpassung der Säurebehandlung für TW -Proben	S. Gey
16	25.09.2019	Redaktionelle Überarbeitung Membranfiltration	S. Gey
17	20.03.2020	Neue UBA-Empfehlung eingearbeitet	S. Bösche
18	15.03.2021	Redaktionelle Überarbeitung, Verfahrenskenndaten	S. Gey
19	29.09.2022	Redaktionelle Änderungen und Spülung nach Säurewaschung mit sterilem Leitungswasser statt entionisiertem Wasser	K. Lehmann
20	12.04.2023	Einarbeitung neue TrinkwV (31.03.23) und UBA-Empfehlung vom 09.12.22 (Änderung Ergebnisan-gabe), Überarbeitung Rezeptur Waschpuffer	S. Gey
21	16.04.2024	Einfügen der händischen Änderungen zur neuen Norm DIN 19643-1 (2023-06) – geändertes Vorgehen bei Badebeckenwasser	S. Gey



## Probenahme

Zu beachten sind:

- Bei schwach belasteten Wässern:
  - PN-Vorschrift AA 076-1 „Probenahme Trinkwasser“
  - UBA-Empfehlung „Systemische Untersuchungen von Trinkwasser-Installationen auf Legionellen nach Trinkwasserverordnung - Probenahme, Untersuchungs-gang und Angabe des Ergebnisses“ vom 18.12.2018
- Bei stark belasteten Wässern:
  - AA 076-7 „Probenahme Verdunstungskühlanlagen, Kühltürmen und Nassab-scheidern“
  - UBA-Empfehlung vom 06.03.2020: Empfehlung des Umweltbundesamtes zur Probenahme und zum Nachweis von Legionellen in Verdunstungskühlanlagen, Kühltürmen und Nassabscheidern
  - VDI 2047

Als Probenahmegefäße werden 500 ml-, 250 ml- und 125 ml- Flaschen genutzt. Dies können Glasflaschen mit Schraubverschluss (autoklaviert bei 121 °C) oder sterile Einmal-Plastikgefäße sein.

## Lagerung bis zum Ansetzen der Proben

Die Proben sind lichtgeschützt bei Umgebungstemperatur oder gekühlt zu transportieren und nach Eingang im Labor im Kühlschrank lagern. Möglichst innerhalb von 24 h, spätestens 48 h nach Probenahme mit der Untersuchung beginnen.

Schwach und stark belastete Wässer sind getrennt voneinander zu lagern, um eine Kreuzkon-tamination zu vermeiden.

- Bei schwach belasteten Wässern:
  - Im Kühlschrank ( $5 \pm 3^\circ\text{C}$ ) lagern und innerhalb von 24 h ansetzen
  - Ansatz innerhalb von 48 h möglich, wenn bereits ab der Probenahme gekühlt wurde
- Bei stark belasteten Wässern:
  - im Kühlschrank ( $5 \pm 3^\circ\text{C}$ ) lagern
  - verwendet der Anlagenbetreiber keine, oder Biozide, die von der Untersu-chungsstelle inaktiviert werden konnten, erfolgt der Ansatz vorzugsweise inner-halb von 24 h, maximal innerhalb 48 h
  - kann das Biozid nicht inaktiviert werden, erfolgt der Ansatz am Tag der Proben-ahme.





### Geräte und Chemikalien



Brutschrank, Lab-Pipetten, Spitzen, Filtrationseinheit, Membranfilter mit 0,22 µm oder 0,45µm Porengröße, Pinzette, Bunsenbrenner zum Abflammen, GVPC-Platten (cysteinhaltig), Nähr- und/oder Blutagarplatten (cysteinfrei), BCYE- und BCYE+AB-Agar-Platten

Reagenzien für Säurewaschung: HCl/KCl-Puffer, KOH-Gebrauchslösung, steriles Leitungswasser

#### Herstellung KOH-Lösung als Neutralisierungslösung:

Gebrauchslösung 1 mol/l KOH (56,1 g KOH-Plätzchen   auf 1l mit ention. Wasser)

#### Herstellung des HCl/KCl-Waschpuffer

- Lösung A: 0,2 mol/l HCl-Lösung:  
17,4 ml konzentrierte Salzsäure   (spezifisches Gewicht 1,18 g/cm<sup>3</sup>, mindestens 35,4 %) werden mit ention. Wasser auf 1 Liter aufgefüllt
- Lösung B: 0,2 mol/l KCl-Lösung:  
14,9 g KCl in ention. Wasser lösen und auf 1 Liter auffüllen.
- Waschpuffer: 156 ml Lösung A und 1 l Lösung B  
2-L-Becherglas auf Rührplatte stellen, erst 1 l Lösung B einfüllen, dann 156 ml Lösung A hinzufügen, Rührfisch dazu und rühren lassen  
pH-Wert mit 1 M KOH- bzw. 0,2 M HCl-Lösung auf 2,2 ± 0,2 einstellen  
In dunkler Flasche bei Raumtemperatur 1 Monat haltbar.

Der hergestellte Waschpuffer wird nicht autoklaviert.

#### Herstellung der Salzlösung nach Page als Verdünnungslösung

- Page-Konzentrat: 1,2 g Natriumchlorid, NaCl,  
0,040 g Magnesiumsulfat, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O  
0,040 g Calciumchlorid, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O  
1,42 g Di-Natriumhydrogenphosphat, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,  
und 1,36 g Kaliumdihydrogenphosphat, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, in 100 ml ention. Wasser.
- Salzlösung nach Page: 10 ml „Page-Konzentrat“ mit entionisiertem Wasser auf 1000 ml verdünnen. Die Lösung bei (121±/-3)°C für (15±/-1) min autoklavieren.

### Durchführung

Bei der Durchführung ist zu unterscheiden zwischen Trinkwasserproben (=Wasser mit geringer Begleitflora) und Proben aus Verdunstungskühlanlagen, Kühltürmen (=Wasser mit hoher Begleitflora).



### Durchführung für Wasser mit geringer Begleitflora (z. B. Trinkwasserproben und Badewasserproben)

Zur Dokumentation das Formblatt „Legionellennachweis TW“ verwenden. Datum und Startzeit der Bearbeitung notieren.

Die Proben sind sowohl mit Direktansatz als auch mit Membranfiltration zu untersuchen. Vor dem Ansatz sind die Proben durch Schütteln zu homogenisieren.

#### Direktansatz:

- 2 x 0,5 ml der Probe auf BCYE+AB Agar ausplattieren
- Platten erst nach vollständigem Antrocknen der Probe umdrehen
- Beschriftung der Platten (Probennummer, Datum)

Säurewaschung wird hier nicht durchgeführt.

#### Membranfiltration mit Säurebehandlung:

- **50 ml** der Probe werden durch Cellulosenitrat-Membranfilter filtriert  
~~Ausnahme: bei Badewasserproben werden 100 ml filtriert, um die geforderte Nachweisgrenze zu gewährleisten~~
- ~~das verwendete Probenvolumen ist auf dem Formblatt zum Legionellennachweis anzukreuzen~~
- die Probenart (Trinkwasser oder Badewasser) ist auf dem Formblatt zum Legionellennachweis anzukreuzen, der zu verwendende Nährboden ist vorgedruckt, nur Änderungen müssen notiert werden
- zur Verminderung von Begleitflora wird das Filter mit ungefähr 30 ml Waschpuffer überschichtet
- nach 5 Minuten wird die Pufferlösung abgesaugt und mit 20 ml sterilem Leitungswasser gespült
- dabei keine Bereiche der Filtrationseinheit mit sterilem Leitungswasser benetzen, die vorher nicht in Kontakt mit dem Waschpuffer waren
- Filter steril aus Filtrationseinheit nehmen und auf eine GVPC- oder BCYE+AB-Platte legen (die Seite, die beim Filtrieren oben lag, muss auch auf der Platte nach oben weisen)
- ~~welcher Nährboden verwendet wurde, wird auf dem Laborantenzettel vermerkt~~
- Beschriftung der Platten (~~Probennummer, Datum~~) mit der Flaschennummer, im Brutschrank werden die Plattenstapel mit Ansatzdatum versehen

Nach ISO 11731 (2017-05) bzw. DIN EN ISO 11731 (2019-03) kommen auch eine Verdünnung der Probe (bei sehr hoher Belastung mit Legionellen) oder eine Aufkonzentration mit Waschschrift (bei geringer Belastung mit Legionellen) in Betracht. Laut UBA-Empfehlung ist dies für systemische Untersuchungen nach TrinkwV nicht vorgesehen.



### Durchführung für Wasser mit hoher Begleitflora (z. B. aus Verdunstungskühlanlagen und Kühltürmen)

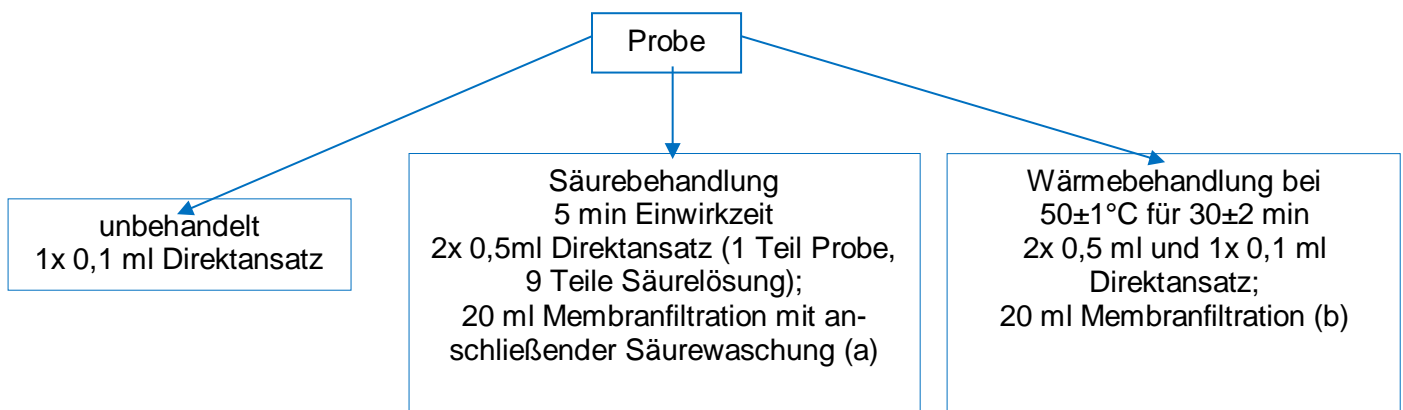
Zur Dokumentation das Formblatt „Legionellennachweis RKW“ verwenden. Datum und Startzeit der Bearbeitung notieren.

Vor dem Ansatz sind die Proben durch Schütteln zu homogenisieren.

Im Regelfall werden die Proben folgendermaßen bearbeitet:

- 1 Teil Wärmebehandlung (2x 0,5 ml, 1x 0,1 ml Direktansatz und 1x 20 ml Membranfiltration),
- 1 Teil Säurebehandlung (2x 0,5 ml Direktansatz, 1x 20 ml Membranfiltration),
- 1 Teil unbehandelt (0,1 ml Direktansatz).

Sind extrem hohe Konzentrationen zu erwarten, kann vor dem Ansatz mit „Salzlösung nach Page“ 1:10 verdünnt werden.



#### Wärmebehandlung

Die Probe wird in einen sterilen Behälter gegeben und dieser für  $30 \pm 2$  min in ein Wasserbad  $50 \pm 1^\circ\text{C}$  gestellt. Die 30 min zählen ab Erreichen der Temperatur (in Referenzgefäß prüfen). Danach Proben rasch abkühlen, z.B. im kalten Wasserbad. Nur abgekühlte Proben weiter bearbeiten.

- Membranfiltration von 20 ml Probe (b)
- Direktansatz mit 2x 0,5 ml
- Direktansatz mit 1x 0,1 ml

#### Membranfiltration

- a) 20 ml der Probe werden durch einen Cellulosenitrat-Membranfilter filtriert und der Filter mit ungefähr 30 ml Waschpuffer überschichtet (=Säurewaschung). Die Pufferlösung wird nach 5 min abgesaugt und mit 20 ml sterilem Leitungswasser gespült. Filter steril aus Filtrationseinheit nehmen und auf GVPC-Platte legen.
- b) 20 ml der wärmebehandelten Probe werden durch einen Cellulosenitrat-Membranfilter filtriert. Filter steril aus Filtrationseinheit nehmen und auf GVPC-Platte legen.

#### Säurebehandlung

0,5 ml Probe werden mit 4,5 ml HCl/KCl-Waschpuffer für  $5 \pm 0,5$  min verdünnt. Nach Ablauf der Zeit wird die Probe sofort auf das Nährmedium aufgetragen. Es ist darauf zu achten, dass beim gleichzeitigen Ansatz von mehreren Proben die Einwirkzeit nicht überschritten wird. Weitere Vorgehensweise siehe Direktansatz (mit 2x 0,5 ml).



### Direktansatz

- 2x 0,1 bis 0,5 ml der (ggfl. vorbereiteten und vorbehandelten) Probe auf GVPC-Platten ausplattieren; Volumen und Art der Probenvorbehandlung notieren. Regelfall: Unbehandelt: 0,1 ml, vorbehandelt: 0,1 und 0,5 ml.
- Platten erst nach vollständigem Antrocknen der Probe umdrehen
- Beschriftung der Platten (z.B. Probennummer)

### Inkubation im Brutschrank

- **10 Tage** bei  $36 \pm 2^\circ\text{C}$
  - nach Empfehlung des Konsiliarlaboratoriums Dresden sollten die Platten im Brutschrank zusätzlich in nicht verschlossene Plastiktüten gelegt werden, da die gewachsenen Kolonien schnell austrocknen (kein CO<sub>2</sub>-Brutschrank vorhanden) – humid!
  - Die Platten werden zum ersten Mal nach **2 bis 5 Tagen**, gefolgt von einer abschließenden Kontrolle am Ende der Bebrütungszeit (nach **10 Tagen**), untersucht und dokumentiert.
  - Dies soll das Risiko des Überwachsens minimieren.
- *Morphologie kontrollieren (ggf. unter Binokular) und evtl. mit Referenzstämmen vergleichen (das Erscheinungsbild der Kolonien sieht auf dem Direktansatz anders aus als bei der Filtration und bei hoher Begleitflora mitunter anders als „saubere“ Referenzstämme)*

### **Kontrolle auf Wachstum und Morphologie bei Proben von Ausbruchsfällen:**

Liegt ein Ausbruch vor, werden die Platten bereits an Tag 2 das erste Mal auf Wachstum und Morphologie kontrolliert. So wird ermittelt, ob gegeben falls eine Verdünnung notwendig ist. Muss eine zusätzliche Verdünnung angesetzt werden, ist dies auf dem Laborantenzettel zu vermerken.

### Bestätigung verdächtiger Kolonien

Blutagar-Platte	BCYE-Agar	Ergebnis
Wachstum positiv		Keine Legionellen
Wachstum negativ	Wachstum negativ	Keine Legionellen
<b>Wachstum negativ</b>	<b>Wachstum positiv</b>	<b>Legionellen</b>

### Für Wasser mit geringer Begleitflora:

Subkulturen werden von den Platten mit der höchsten Anzahl verdächtiger *Legionella*-Kolonien angelegt.

Von den Legionella – verdächtigen Kolonien werden mind. 3 Kolonien (wenn nur ein Kolonietyp) oder mindestens eine Kolonie pro Typ (bei mehreren Kolonietypen) auf Blutagar (cystein-frei) und auf BCYE-Agar subkultiviert.

Sorgfältig ist darauf zu achten, dass mit der Kolonie kein Nährmedium übertragen wird und zuerst die Blutagar-Platte beimpft wird. Die Platten werden bei  $36 \pm 2^\circ\text{C}$  für 2 bis 5 Tage bebrütet. Kolonien, die in den ersten 1 bis 2 Tagen auf Blutagar-Platten wachsen, sind in der Regel keine Legionellen. Die Kolonien, welche auf der BCYE-Agar-Platte wachsen, auf der Blutagar-Platte jedoch nicht, werden als *Legionella* betrachtet.

→ bei fraglichem Wachstum wird die Subkultur wiederholt.



Für Wasser mit hoher Begleitflora (UBA-Empfehlung S. 10/11):

- grundlegende Vorgehensweise wie bei Wässern mit geringer Begleitflora
- Um den Arbeitsaufwand zu reduzieren, wird zunächst der Ansatz bestätigt, der zur Ergebnisangabe herangezogen wird
- Ansatz auswählen, bei dem sich die höchste Legionellenkonzentration ergibt (unter Berücksichtigung des Probenvolumens und der Messunsicherheit)  
Beispiel: statt Platte mit 1-2 Kolonien, Platte mit 3-9 Kolonien wählen, auch wenn das Endergebnis dadurch niedriger ist, die Begleitflora sollte ebenfalls möglichst gering sein
- Von ausgewähltem Ansatz mit einem verdächtigen Kolonietyp 3 Kolonien bestätigen, mit mehreren verdächtigen Kolonietypen jeweils mindestens eine Kolonie bestätigen (DIN EN ISO 11731)
- Wenn keine verdächtigen Legionellen bestätigt werden können, verdächtige Legionellen von anderem Ansatz prüfen

Subkulturen bei Proben von Ausbruchsfällen:

Im Rahmen von Ausbruchsgeschehen werden bei nur einem vorhandenen Kolonietyp mindestens 5 Kolonien mit Hilfe von Blutagar und BCYE-Agar bestätigt. Liegen mehrere Kolonietypen vor, werden mindestens 2 Kolonien jeden Typs bestätigt.



## Angabe der Ergebnisse für Wasser mit geringer Begleitflora

### a) Trinkwasser

Obere Auszählgrenzen: Direktansatz: 300 Kolonien pro Platte (Ziel- und Nicht-Zielkolonien)  
Membranfilter: 80 Kolonien pro Filter (Ziel- und Nicht-Zielkolonien)

**Es ist zu beachten, dass die Ergebnisse auf KBE/100 ml hochgerechnet und auf zwei signifikante Stellen gerundet werden müssen.**

Auf dem Prüfbericht ist anzugeben, welcher Ansatz zur Ergebnisangabe verwendet wurde und ob der Technische Maßnahmewert erreicht wird, oder nicht.

Ab dem 24.06.2023 (in Kraft treten neue TrinkwV) gilt ein Wert von 100 KBE/100 ml als Überschreitung!

Neuer Terminus: Der technische Maßnahmewert ist erreicht.

*[nicht wie vorher ab 101 KBE: „überschritten“; jetzt vergleichbar mit Grenzwert: 99 KBE/100 ml]*

Die untere Nachweisgrenze beträgt **<2 KBE/100 ml**. Die obere Nachweisgrenze liegt bei >60 000 KBE/100 ml.

Falls der Direktansatz und die Membranfiltration positive Ergebnisse liefern, wird als Endergebnis zum Zwecke des vorbeugenden Gesundheitsschutzes, nach getrennter Berechnung, der **höhere Wert angegeben**.

*Hinweis: Hohe Zahl auf Direktansatz und kein Wachstum auf Filtern ist bei non-pneumophila-Spezies möglich.*

Ergebnisse von Platten und Filtern mit starker Kontamination durch Begleitorganismen sind mit einer Unsicherheit behaftet und sollten nicht für die Ergebnisangabe verwendet werden. Unterliegen alle Platten einer hohen Kontamination, ist die Untersuchung zu wiederholen. Ist eine Wiederholung unmöglich oder weist erneut eine starke Kontamination auf, ist dies im Prüfbericht zu vermerken.

### Berechnung und Beispiele:

- keine Legionellen auf allen Ansätzen: <2 KBE/100 ml
- die Anzahl der Kolonien beider Direktansätze (jeweils 0,5 ml) wird addiert und mit 100 multipliziert
- ist nur ein Direktansatz auswertbar, wird dessen Koloniezahl verdoppelt und mit 100 multipliziert
- die Anzahl der Kolonien auf dem Membranfilter (50 ml) wird verdoppelt
- obere Auszählgrenze auf allen Ansätzen erreicht: >60 000 KBE/100 ml
- obere Auszählgrenze nur auf Membranfilter erreicht: >160 KBE/100 ml
- bei zu stark ausgeprägter Begleitflora: „nicht auswertbar“
- Ansätze mit nur **1-2 Kolonien** gelten als „nicht quantifizierbar“ und das Ergebnis wird **nicht berichtet**<sup>1</sup> (Angabe als <100 KBE/100 ml)

<sup>1</sup> Koloniezahlen unter 3 KBE/Ansatz (in UBA-Empf. steht „Platte“) sind nach DIN EN ISO 8199: 2021-12 statistisch nicht sicher auswertbar, deshalb Angabe als <100 KBE/100ml



<b>Σ DA (Direktansätze)</b> [Anzahl Kolonien]	<b>MF (Membranfilter)</b> [Anzahl Kolonien]	<b>Endergebnis</b> [KBE/100 ml]	<b>Bewertung</b>
0	0	<2	TMW (Technischer Maßnahmewert) nicht erreicht
0	1-2	<6	TMW nicht erreicht, Legionellen nachweisbar
1-2	0-2	<100	TMW nicht erreicht, Legionellen nachweisbar
0-2	3-49	6-98	TMW nicht erreicht
0-2	50-80	100-160	<b>TMW erreicht</b>
3-600	-	300-60.000	<b>TMW erreicht</b>
>600	-	>60.000	<b>TMW erreicht</b>
-	>80	>160	<b>TMW erreicht</b>
nicht auswertbar und 2	-	400 <sup>2</sup>	<b>TMW erreicht</b>

Vorlagen für das Feld „Bemerkung“ im Prüfbericht finden sich nach Eingabe von „-TW-Legionellen%“ → F3

## b) Badewasser

~~Aufgeführt werden nur die Unterschiede zur Vorgehensweise beim Trinkwasser.~~

- die Auswertung erfolgt analog zum Trinkwasser
- welcher Ansatz zur Ergebnisangabe verwendet wurde, muss nicht angegeben werden<sup>3</sup>
- ~~- keine Legionellen auf allen Ansätzen: 0 KBE/100 ml (entspricht <1 KBE/100 ml)~~
- ~~- das Ergebnis der Membranfiltration wird nicht verdoppelt (100 ml Ansatz)~~
- bei der Auswertung ist wie bisher die DIN 19643-1 zu berücksichtigen

<sup>2</sup> Trotz fehlender statistischer Sicherheit sind im Sinne des vorbeugenden Gesundheitsschutzes die 400 KBE/100ml zu berichten [Vortrag Dr. Sven Steinhauer, GBA Group, 05.04.23]

<sup>3</sup> „Die Empfehlung vom 18. Dezember 2018 in Verbindung mit der Aktualisierung vom 09. Dezember 2022 kann **sinngemäß** für die Legionellenuntersuchungen in Beckenwasser und Filtrat angewendet werden...“ [UBA-Empfehlung vom 09.12.2022]



**Angabe der Ergebnisse für Wasser mit hoher Begleitflora (z. B. aus Verdunstungskühlanlagen):**

**Die Ergebnisse werden grundsätzlich auf KBE/100 ml hochgerechnet und auf zwei signifikante Stellen gerundet.**

Zur Ergebnisangabe wird der Ansatz verwendet, der die **höchste Legionellenkonzentration** (KBE/100 ml) bei **akzeptabler analytischer Sicherheit** ergeben würde (siehe Tabelle nächste Seite).

D.h., es werden gegenüber Ansätzen mit 1 - 2 Kolonien solche Ansätze bevorzugt, die mindestens 3 Kolonien pro Ansatz und möglichst wenig Begleitflora aufweisen. Auch dann, wenn auf diese Weise ein niedrigeres Endergebnis erzielt wird.

Da erfahrungsgemäß auf den Membranfiltern tendenziell weniger Kolonien wachsen, als auf den Direktansätzen, ist deren Wahl zur Ergebnisangabe situationsbedingt zu hinterfragen.

Sind beide Ansätze der **Wärmebehandlung** auswertbar (E.3.2), ist das **gewichtete Mittel** mit dem Ergebnis aus 0,1 ml und 1 ml Probe zu bilden.

Bei 1-2 Kolonien pro Ansatz sind quantitative Aussagen nicht möglich.

Bei 3-9 Kolonien pro Platte können semiquantitative Ergebnisse bzw. Ergebnisse mit erhöhter Messunsicherheit angegeben werden. Die erhöhte Messunsicherheit muss bei solchen Ergebnissen im Bericht vermerkt werden.

Ab 10 Kolonien pro Platte können quantitative Ergebnisse angegeben werden.

Die **obere Auszählgrenze** von **80 Legionellenkolonien pro Membranfilter** bzw. **150 Legionellenkolonien pro 90 mm-Platte im Direktansatz** ist zu beachten. Wenn nur Ergebnisse über der Auszählgrenze vorliegen, ist das Endergebnis als „größer als“ anzugeben.

Im Prüfbericht müssen zum ergebnisrelevanten Ansatz folgende Angaben gemacht werden:

Vorbehandlung/Ansatz, Volumen, gezählte Kolonien, verwendetes Nährmedium, eventuelle Minderbefunde und erhöhte Messunsicherheit durch Begleitflora und die Messunsicherheit des Verfahrens (siehe Tabelle nächste Seite).

Zusätzlich müssen im Prüfbericht alle Angaben zu finden sein, die auch auf dem Probenahmeprotokoll vermerkt sind. D.h. auch Angaben zum Biozideinsatz, der Anlagenart, Probenahmetechnik und Probeneingang im Labor.

Die Bemerkung auf dem Prüfbericht ist der UBA-Empfehlung vom 06. März 2020 (Seite 18-24) zu entnehmen. Diese Sätze sind im LabBase hinterlegt:

Vorlagen für das Feld „Bemerkung“ im Prüfbericht finden sich nach Eingabe von „-Legionellen%“ → F3

Ist überhaupt kein Ansatz auswertbar, weil alle Platten überwachsen sind, muss dies im Prüfbericht erscheinen. In diesem Fall darf kein Wert (auch nicht „Null“) berichtet werden.



**Aussagen zur Messunsicherheit nach UBA:**

Ansatz nach UBA	Volumen der Originalprobe im Ansatz	Anzahl der Legionellenkolonien pro Ansatz	Messunsicherheit
E.2.1 oder E.2.2	20ml	0-2	stark erhöhte Messunsicherheit
		3-9	erhöhte Messunsicherheit
		10-80	geringe Messunsicherheit
E.3.2	1ml=2*0,5ml	0-2	hohe Messunsicherheit, keine quantitative Ergebnisangabe möglich. Die berechneten Konzentrationen können nur zur Orientierung dienen.
		3-9	erhöhte Messunsicherheit
		10-300	geringe Messunsicherheit
E.3.2	0,5ml	0-2	hohe Messunsicherheit, keine quantitative Ergebnisangabe möglich. Die berechneten Konzentrationen können nur zur Orientierung dienen
		3-9	erhöhte Messunsicherheit
		10-150	geringe Messunsicherheit
E.3.1 oder E.3.2 oder E.3.3	0,1ml oder 2*0,05ml	0-2	sehr hohe Messunsicherheit, keine quantitative Ergebnisangabe möglich. Die berechneten Konzentrationen können nur zur Orientierung dienen
		3-9	erhöhte Messunsicherheit
		10-150 oder 300	geringe Messunsicherheit
E.3.3	0,05ml	0-2	sehr hohe Messunsicherheit, keine quantitative Ergebnisangabe möglich. Die berechneten Konzentrationen können nur zur Orientierung dienen
		3-9	erhöhte Messunsicherheit
		10-150	geringe Messunsicherheit

Bei Legionellenbefunden im Nutzwasser von Verdunstungskühlanlagen **von >10.000 KBE/100 ml, müssen die Legionellen durch ein akkreditiertes Labor typisiert werden.**

Es wird nach der 42. BImSchV die Differenzierung in *Legionella pneumophila* - Serogruppe 1, *Legionella pneumophila* – Serogruppe 2-14 (andere Serogruppen) bzw. andere Legionellenarten (*Legionella non-pneumophila*) gefordert.

Entweder wird bei uns der Agglutinationstest (siehe nächste Seiten) durchgeführt oder werden die Platten an das Legionellen-Konsiliarlabor der TU Dresden (Dr. Lück) zur Typisierung gegeben (Ausnahmefall).



Wurde nach der Kontrolle der Platten an Tag 2 eine zusätzliche Verdünnung der Probe angesetzt (Ausbruchsfall), ist im Prüfbericht auf die potentiell negativen Auswirkungen der Konservierung der Probe für 2 zusätzliche Tage hinzuweisen.

**Messunsicherheit:** ± 125% (aus Ringversuchsergebnissen berechnet)

### **Störungen**

- Begleitkeime können das Zählergebnis verfälschen oder das Wachstum von Legionellen vollständig unterbinden → falsch negative Ergebnisse möglich  
(wenn nur Platten zur Auswertung vorliegen die Kontaminationen durch Begleitkeime aufweisen, ist die Untersuchung zu wiederholen)
- falls Wiederholung nicht möglich, dann müssen Art und Koloniezahl der Begleitkeime bzw. zumindest der Hinweis „hohe Begleitflora“ bei der Angabe der Ergebnisse festgehalten werden

### **Maßnahmen zur Qualitätssicherung**

- regelmäßiges Überimpfen (1x im Monat) der Referenzkulturen
- Waschpuffer in einem gut verschlossenem Glasgefäß bei Raumtemperatur nicht länger als 1 Monat lagern
- Verfallsdatum der fertig gelieferten GVPC-, BCYE-, BCYE-AB und Blutagar-Platten beachten
- Kontrollieren der Temperatur des Brutschranks (siehe Datenlogger-Auswertung)

### **Ermittlung der Verfahrenskenndaten:**

Bei Einführung neuer Verfahren oder grundlegenden Änderungen (z.B. Änderung des Nährmediums) sind folgende Verfahrenskenndaten zu ermitteln:

- Relative laborinterne Zählunsicherheit: zwischen 2 und 10 %
- Wiederholpräzision: idealerweise < 5%
- Zählunsicherheit der einzelnen Mitarbeiter: Ø 2 bis 10 %



### Legionella- Typisierung mit Legionella Latex Test der Fa. OXOID (2016-05)

Der bei Bedarf zur Anwendung kommende Agglutinationstest DR-800 soll als Bestätigungstest für einen Legionellenbefund dienen.

Bei dem OXOID Legionella-Latex-Test werden blaue Latexpartikel verwendet, die mit Antikörpern beladen sind. Bei Anwesenheit spezifischer Legionellenzellwand-Antigene kommt es zu einer Verklumpungsreaktion (Agglutination).

Mit diesem Test können so die häufigsten pathogenen Legionella-Arten und deren Serotypen nachgewiesen werden:

- Legionella pneumophila, Serogruppe 1-14
- Legionella species (spp.): L. anisa
  - L. bozemanii, Serogruppe 1 und 2
  - L. dumoffii
  - L. gormanii
  - L. jordanis
  - L. longbeachae, Serogruppe 1 und 2
  - L. micdadei

#### Bestandteile des Tests:

- Testreagenzien: DR801 Legionella pneumophila Serogruppe 1  
DR802 Legionella pneumophila Serogruppe 2 – 14  
DR803 Legionella spp.
- Positive Kontrollsuspension DR804
- Negative Kontrollsuspension DR805
- Kontroll-Latex DR806
- Suspensionspuffer DR807
- Einweg-Reaktionskarten DR500

Alle Reagenzien bei 2-8°C im Kühlschrank lagern!

#### Zusätzlich benötigte Geräte und Chemikalien:

Bunsenbrenner, Impföse, 0,85% Kochsalz-Lösung (nur bei Reagenzglas-Methoden), Autoklav (für Entsorgung)


#### Durchführung

- Anwendung des Tests nach Bestätigung eines Legionellenbefundes durch Subkultur bzw. bei Unsicherheit
- für den Test werden die auf GVPC-Agar gewachsenen Kolonien verwendet
- Latexreagenzien auf Raumtemperatur bringen und kräftig schütteln
- Vor jedem Test sollte die einwandfreie Reaktion der Latexreagenzien anhand der Kontrollsuspensionen überprüft werden

Legionella- Typisierung mit Legionella Latex Test der Fa. OXOID (2016-05)

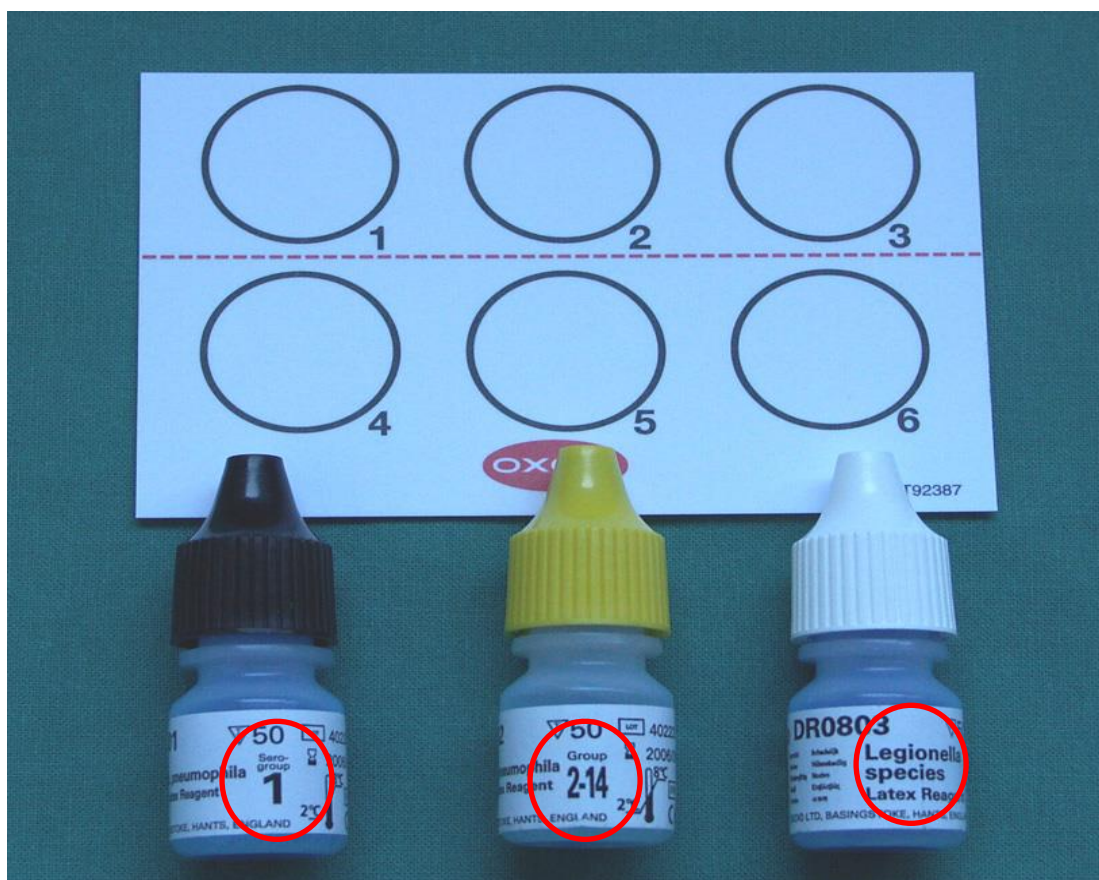
- 2 Möglichkeiten der Durchführung:

##### **a) Direktmethode**

- je 1 Tropfen jedes Latexreagenzes (3 Testreagenzien , 1 Kontroll-Latex ) am Rand der kreisförmigen Testfelder der Reaktionskarte auftragen



- Testreagenz aufgebracht von links nach rechts in folgender Reihenfolge: für SG 1 (schwarz), für SG 2-14 (gelb), für non-pneumophila (weiß)
- je 1 Tropfen Puffersuspension auf jedes der vier Felder auftragen (Puffer und Latexreagenzien dürfen nicht ineinander laufen)
- (je Testfeld) mindestens eine 1 mm große Kolonie von GVPC-Platte mit einer abgeflammt Impföse abnehmen und im Puffer suspendieren (soll möglichst homogen sein)
- Latexreagenzien und Suspensionen werden mithilfe einer Impföse vermischt und gleichmäßig auf gesamtem Testfeld verteilt
- Reaktionskarte für maximal 1 Minute kreisförmig bewegen und auf Agglutination prüfen (keine Lupe verwenden)
- Reaktionskarten nach Gebrauch in Plastiktüten sammeln und autoklavieren



**b) Reagenzglasverfahren** (bei zähflüssiger Konsistenz des Isolates)

- 0,4 ml einer 0,85%igen Kochsalz-Lösung in Reagenzglas geben
- 4 – 10 ähnliche Kolonien mit abgeflammt Impföse von GVPC-Platte abnehmen und in Kochsalzlösung suspendieren
- Schütteln der Zellsuspension bis sie homogen ist
- je 1 Tropfen jedes Latexreagenzes (3 Testreagenzien, 1 Kontroll-Latex ) am Rand der vier kreisförmigen Testfelder der Reaktionskarte auftragen
- mit Pipette je 1 Tropfen der Zellsuspension auf jedes der vier Testfelder auftragen
- Latexreagenzien und Suspensionen werden mithilfe einer Impföse vermischt und gleichmäßig auf gesamtem Testfeld verteilt
- Reaktionskarte für maximal 1 Minute kreisförmig bewegen und auf Agglutination prüfen (keine Lupe verwenden)
- Reaktionskarten nach Gebrauch in Plastiktüten sammeln und autoklavieren




### Auswertung der Ergebnisse

- Klumpt Feld 1 gehören die Legionellen zur Serogruppe 1
- Klumpt Feld 2 gehören die Legionellen zur Serogruppe 2-14
- Klumpt Feld 3 gehören die Legionellen zu legionella non-pneumophila
- Klumpt gar nichts gehören die Legionellen, wenn sie durch Blutagar und BCYE-Agar bestätigt wurden, ebenfalls zu legionella non-pneumophila
- Klumpt die Kontrollreagenz ist das Ergebnis nicht auswertbar

- Bei nicht homogenen Reaktionen können feinkörnige oder faserige Ausflockungen entstehen. Klärt sich dabei der blaue Hintergrund des Testreagenzes, gilt der Test ebenfalls als positiv.

Ein negatives Ergebnis bedeutet nicht automatisch, dass in der Probe keine Legionellen enthalten sind, sondern nur das es sich nicht um die oben aufgeführten Arten handelt!  
Aufgrund der möglichen hohen Virulenz von L. pneumophila SG 1 sollten Proben mit einem solchen positiven Befund für weitere Untersuchungen in das Konsiliarlaboratorium Dresden geschickt werden.

### Arbeitsschutz

- Einhalten entsprechender Vorsichtsmaßnahmen, da pathogene Organismen im Probenmaterial enthalten sein können.
- Reagenzien des Agglutinationstests enthalten zur Konservierung 0,1% Natriumazid 
- Vermeidung von Aerosolbildung (Infektion mit Legionellen ist durch Einatmen möglich)

### Maßnahmen zur Qualitätssicherung

- Reagenzien bei 2° bis 8°C lagern
- Verfallsdatum der Reagenzien beachten
- Reaktion der Latexreagenzien anhand der Kontrollsuspensionen vor den Tests überprüfen:
  - bei positiver Kontrollsuspension DR804: sichtbare Agglutination mit Latexpartikel innerhalb 1 Minute
  - bei negativer Kontrollsuspension DR805: keine Agglutination mit Latexpartikel innerhalb 1 Minute
- bei anderen Reaktionen sollte Test nicht verwendet werden
- Probenmaterial auf Reaktionskarte nicht mit Tropfpipette der Reagenzien berühren, da Kontaminationsgefahr
- Reagenzien fest verschließen, um Austrocknung oder Kontamination zu vermeiden