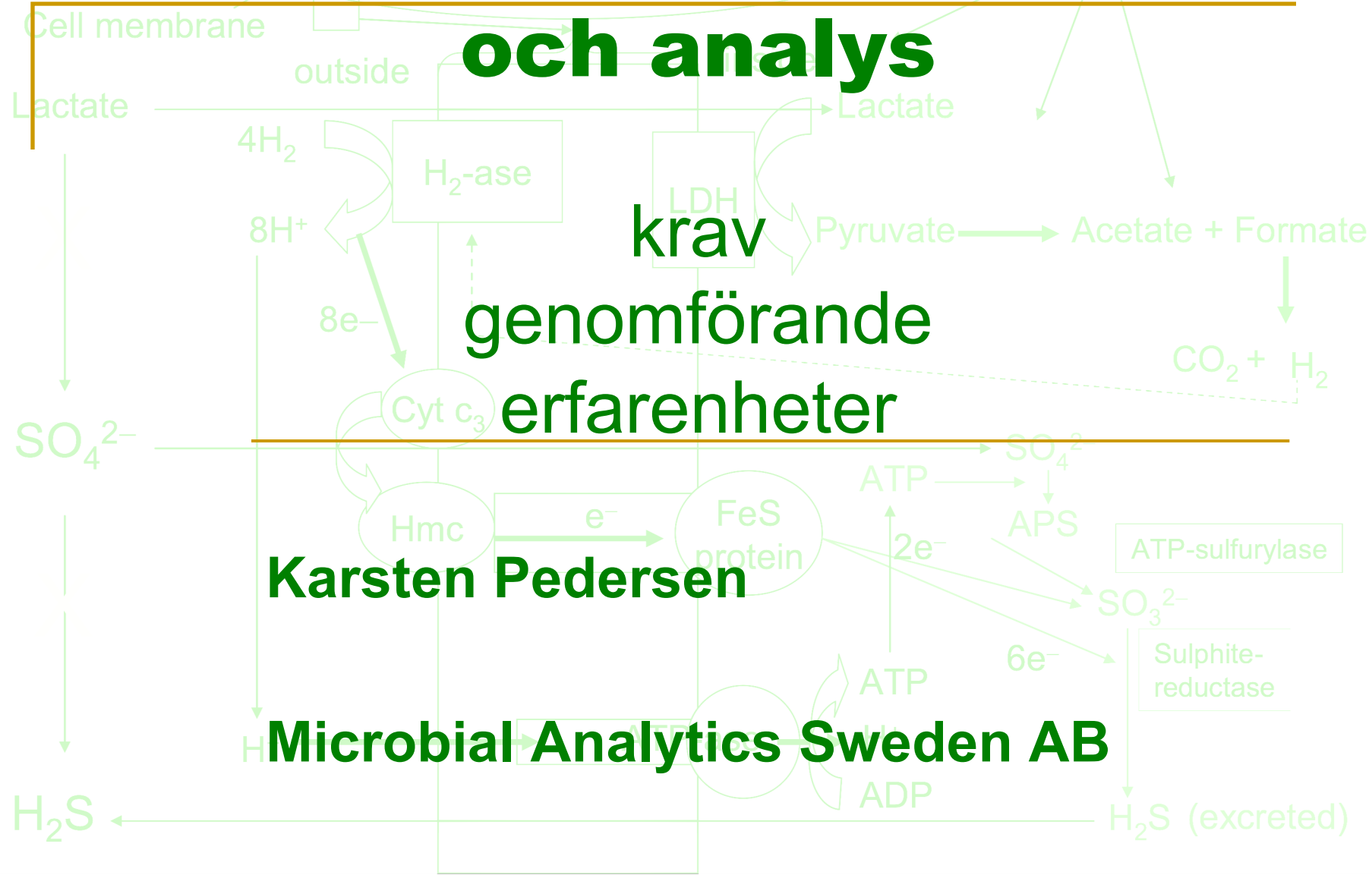


Legionella Provtagning och analys



Karsten Pedersen

Microbial Analytics Sweden AB

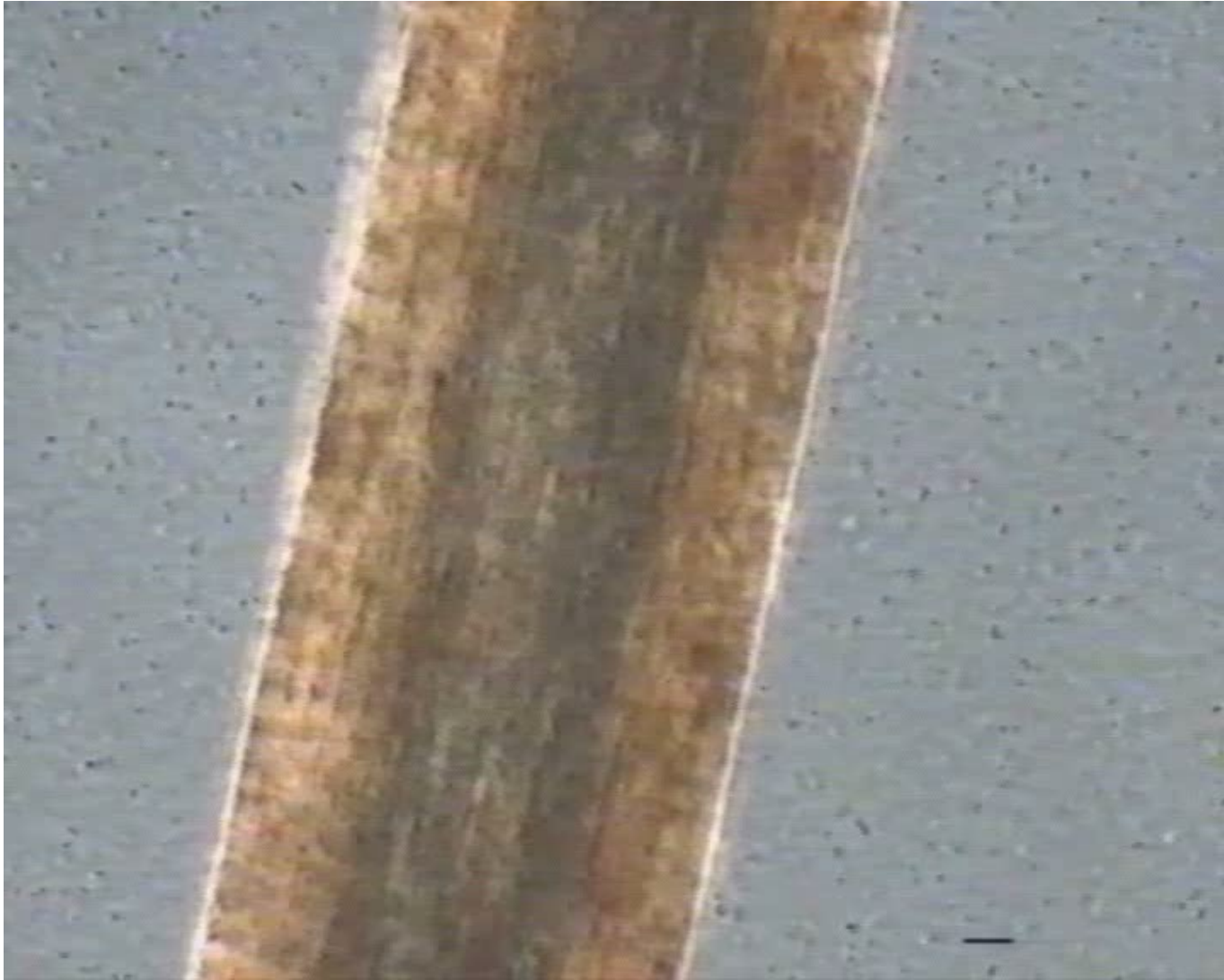
Sulphate-reducing

Genetic control

krav

genomförande
erfarenheter

Skala: Bakterier är små!



Provtagning av tappvatten

- Tappvarmvatten
 - Dusch
 - Kran
- Tappkallvatten
 - Dusch
 - Kran
- Varmvattencirkulation om sådan finns
 - Retur och ev. utgående varmvatten



Utrustning

- Termometer och kärl för temperaturmätning
- Provflaskor, får ej skjöljas eller toppfyllas
- Transportlåda och kylklamp(ar), beställs från Micans
- Verktyg för att vid behov avlägsna blandare
- Plastpåsar (nya, rena) som kan användas för prov från duschspridare

Varmt eller kallt eller vatten från blandare?

- Duschar kan ställas in på cirka 37 °C. Då får du ett prov på blandat vatten. Om provet tas från duschspridare visar provet vad man exponeras för vid en dusch.
- Om Legionella förekommer börjar en spårning av tillväxtplatsen: duschmunstycket, duschslag, blandare, lokalt rörnät, eller växer Legionella längre in i vattensystemet?
- Vid förekomst av Legionella behöver man provta både spolat och ospolat kallt och varmt vatten för att ta reda på var bakterierna växer, i kallvattensystemet, varmvattensystemet eller i båda. Då kan duschblandaren behöva demonteras.

Provtagning spolat/ospolat

- Tappvatten kan provtas både som **ospolat** och **spolat**. I vissa fall sker tillväxten av Legionella lokalt, nära tappstället, den förekomsten fångas upp av ett ospolat prov. I andra fall kan tillväxten ske i varmvattenberedare, rörledningar och andra enheter långt från tappstället. Den förekomsten fångas upp efter en tids spolning.
- Ett **ospolat prov** tas direkt ur systemet så snart vattnet rinner med en jämn stråle.
- Hur länge man sedan ska spola för att få ett **spolat prov** beror på hur långt det är till varmvattencentralen, varmvattenberedaren eller ledningsnätet med kallvatten. En bra regel är att spola tills en jämn varm / kall temperatur erhålls.

Transport

- Prover ska skickas med snabb och säker transport till laboratoriet. Observera att proverna ska levereras direkt till laboratoriet (inte till utlämningsställen).
- Gällande standard för vattenundersökningar (*SS-EN ISO 19458:2006*) rekommenderar att prov för Legionella ska analyseras inom cirka 24 timmar. Det anses vidare acceptabelt med analys inom cirka 48 timmar under förutsättning att provet hålls kylt på $5\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ fram till analys.

Miljöanalys av Legionella



Microbial Analytics Sweden AB

Sulphate-reducing
bacterium



Genetic control

Cell membrane

Lactate

Lactate

$4H_2$

$8H_2$

Acetate + Formate

$CO_2 + H_2$

SO_4^{2-}

4^{2-}

S

ATP-sulphurylase

SO_3^{2-}

Sulphite-reductase

ATP

ADP

H_2S

H^+

H_2S (excreted)

Gällande standard - krav

- En förbättrad standard, ISO 11731:2017, ersätter de gamla, **upphävda** standarderna 11731-1 och 11731-2.
- Provtyper
 - Legionella i **tappvatten**, varmt, kallt, dusch, spolat, ospolat, tandläkarvatten
 - Legionella i **bassängbad**
 - Legionella i **industriella miljöer**, t.ex. processvatten eller kyltorn
 - Legionella i **bioreningsanläggningar**
 - Legionella i **fasta material**, t.ex. biofilm, jord, sediment och filtermassa (omfattas ej av standard).

Utmaningar

- Legionella förekommer ofta i låga antal i jämförelse med det totala antalet bakterier i många tappvattenprov.
- I processvatten kan det finnas höga halter Legionella, analysen måste täcka upp ett stort intervall colony forming unites (cfu).
- Utan åtgärd kan så kallad bakgrundsväxt konkurrera ut Legionella.
- Därför måste näringssubstraten, "plattorna" anpassas för växt av Legionella och blockera växt av andra bakterier.
- Legionella har mycket speciella krav på näringstillgång, den är ju en intracellulär parasit som utnyttjar sin värdorganism.

Näringssubstrat för Legionella

- Måste ha de ämnen Legionella kräver
 - Aminosyran Cystein
 - Låga halter metaller, aktivt kol tillsätts vilket ger plattorna svart färg
- Ska samtidigt selektera så att huvudsakligen Legionella växter
 - Olika "cocktails" av antibiotika
 - Syrabehandling
 - Värmebehandling

Näringssubstrat i ISO 11731:2017

- BCYE
 - *Buffered Charcoal Yeast Extract*

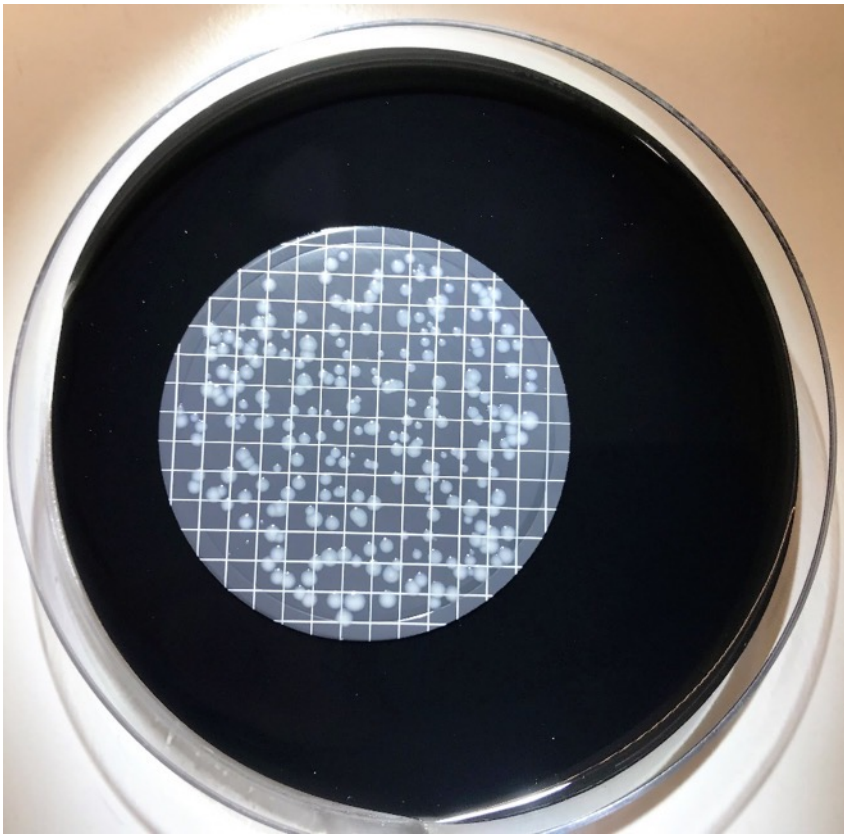
- GVPC
 - BCYE med *Glycin Vancomycin Polymixin B Cycloheximide*

Stegvis ökad selektivitet för Legionella

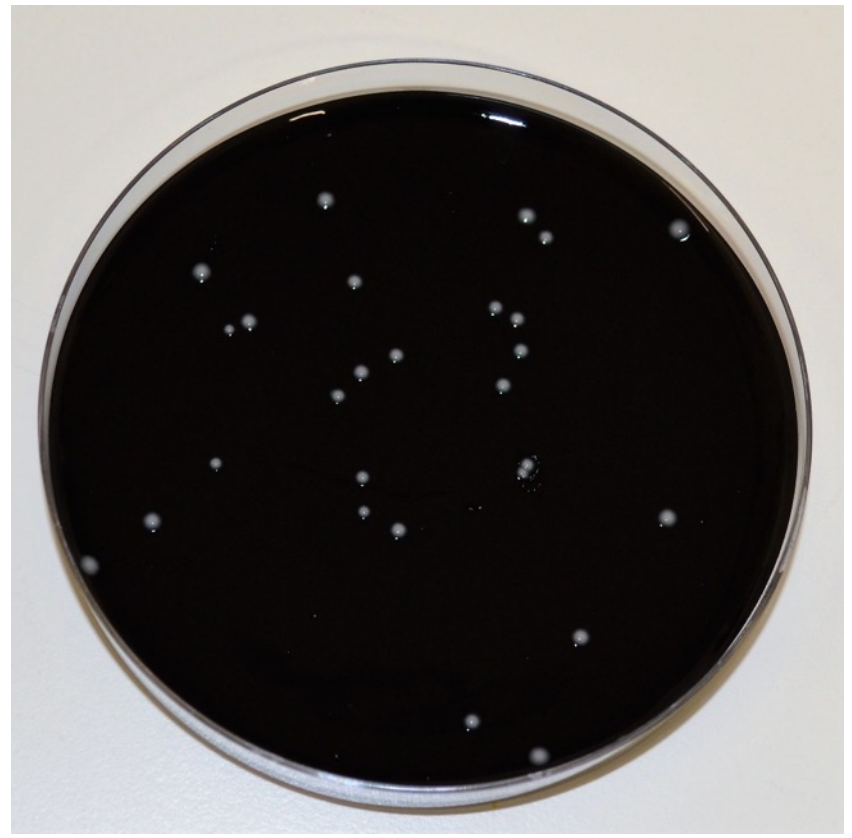
- BCYE-platta, ett basmedium
 - Tappvatten
- GVPC-platta (BCYE+antibiotika) + syrabehandling
 - Tappvatten, processvatten med bakgrund
- GVPC-platta (BCYE+antibiotika) + värmebehandling
 - Processvatten med hög bakgrund, t.ex. kyltorn
- GVPC-platta (BCYE+antibiotika) + syra- och värmebehandling
 - Vatten från bioreningsanläggning med mycket hög bakgrund

Anpassning efter provtyp

Låga antal filtreras, cfu
räknas

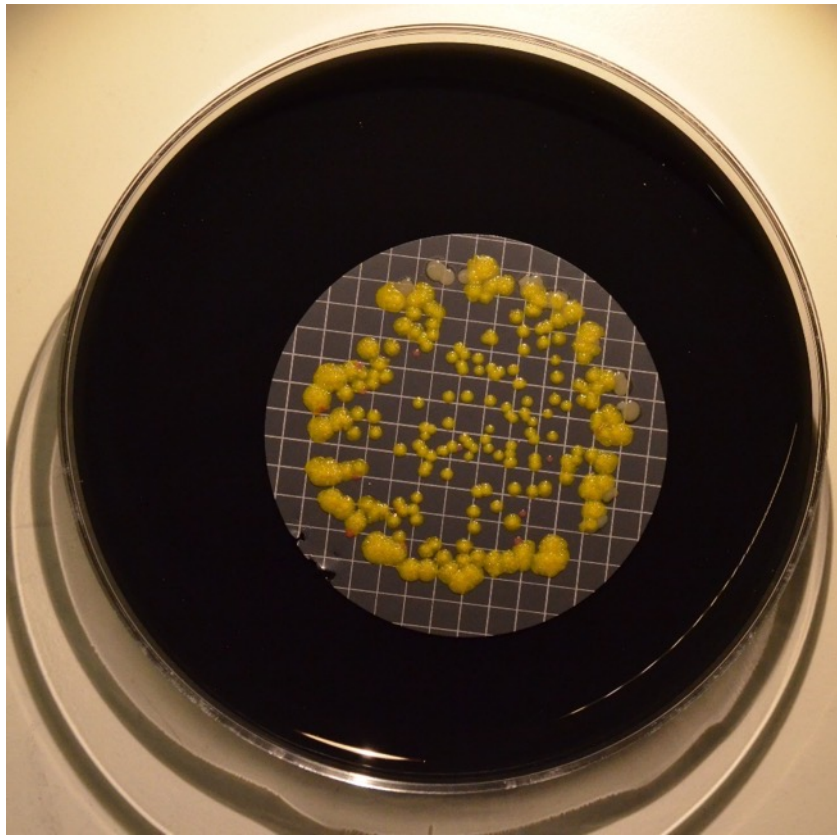


Höga antal direkt på platta

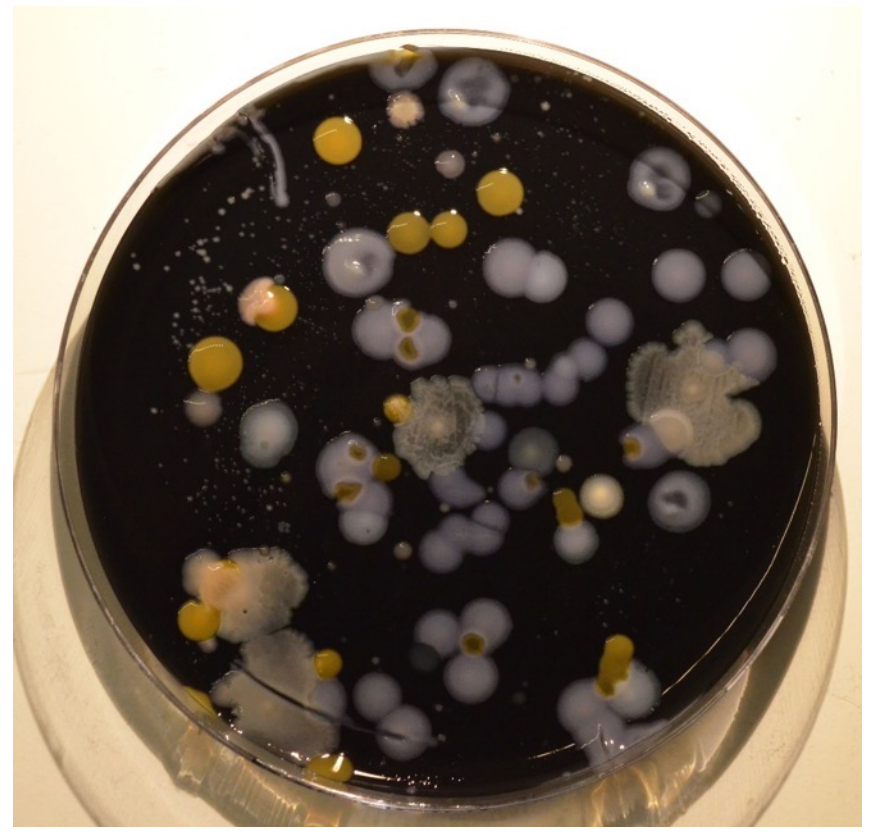


Bakgrund

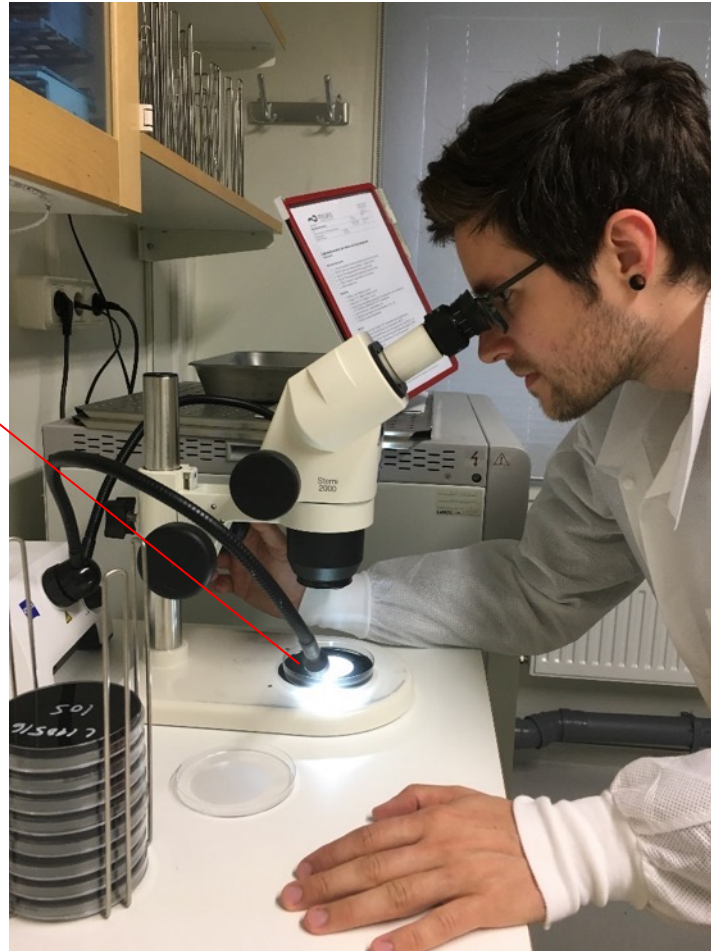
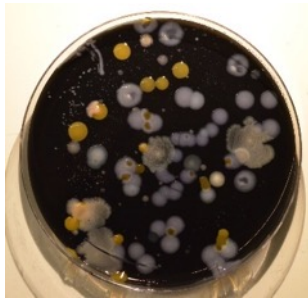
På filter – lätt denna gång
– inte Legionella



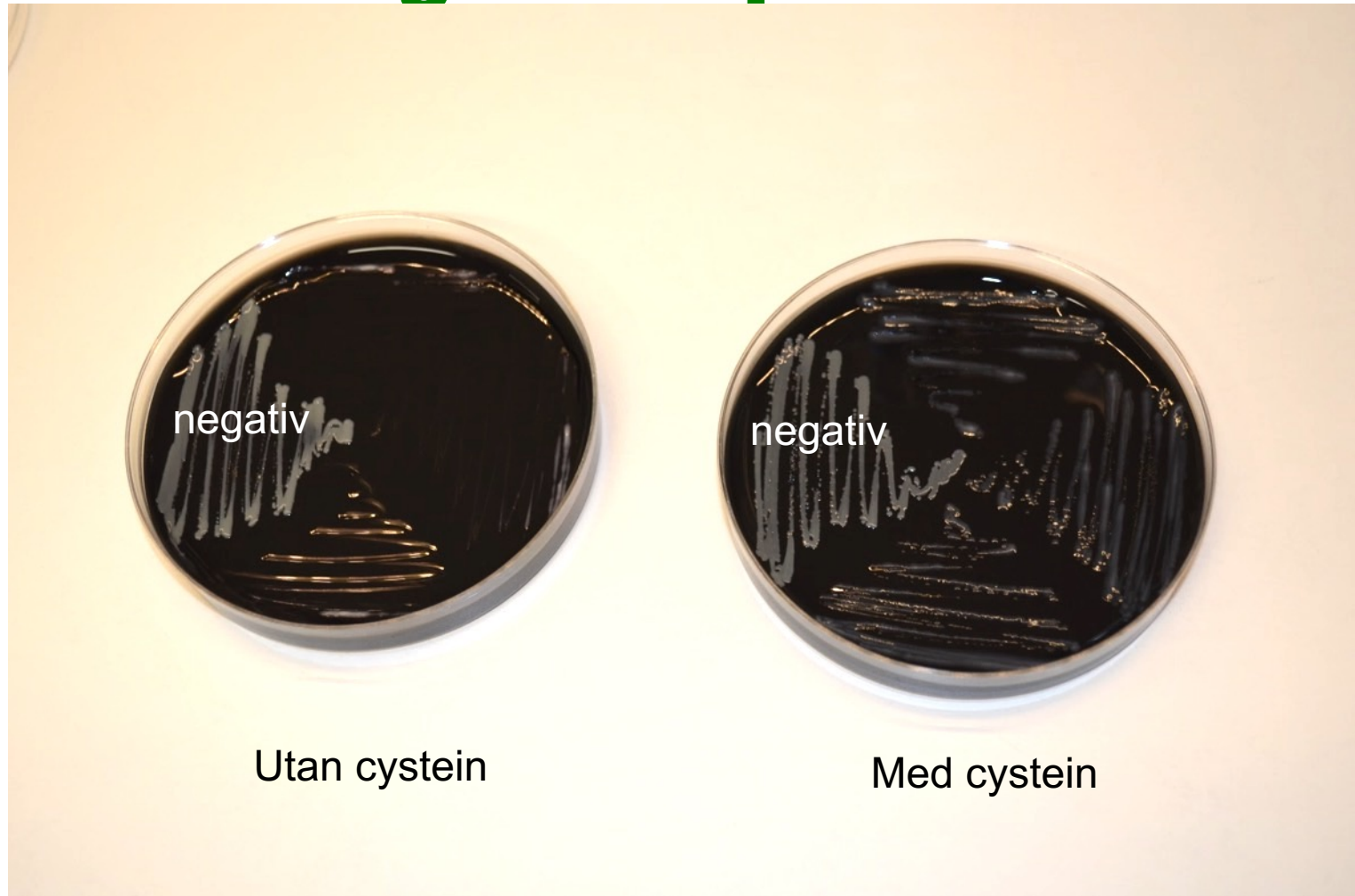
På platta – vem är vem?



Mikroskopering och identifikation i lupp kräver erfarenhet



Verifiering av 4 kolonier: 1 negativ 3 positiva



Enhet för Legionella i vatten

- Denna enhet gäller enligt ISO 11731:2017

Colony forming units / L water

cfu/L

- Andra enheter kan förekomma, särskilt på äldre provsvar, t.ex. cfu/100 mL, cfu/500 mL, men de måste räknas om till cfu/L

Krav på analysrapporter

ISO 11731:2017 och ISO 17025:2017



PROVSVAR

Slutsvar

Micans
Karsten Pedersen
Bruksgatan 17
435 35 Mölnlycke

Micans nr. L221839
Utfärdat datum 2023-01-04
Provtyp^k Tappvarmvatten ospolat
Provplats^k Micans
Prov märkt^k 415 ospolat VV
Provtagare^k Karsten
Provtagningsdatum^k 2022-12-28 13:00
Provtagnings-temp.^k 19.5 °C
Ankomstdatum 2022-12-28 13:00
Analysdatum 2022-12-28 13:00

Provtemperatur

	Resultat	Enhet	Metodreferens
Ankomsttemperatur	19.5	°C	Ebro TFI 250 infraröd termometer (±1.5 °C)

Analysresultat

	Resultat	Enhet	Metodreferens
*Legionella species	200	cfu/liter	ISO11731:2017(E)

*Akrediterad analys

Mätosäkerheten för kvantitativa provresultat kan lämnas ut vid förfrågan.
Resultaten gäller för provet när det ankommit till laboratoriet.

^k = Uppgifter som lämnats av kund.

Största analyserade provvolym (ml): 200

Kommentar

Legionella påvisad.

Granskad och godkänd

Karsten Pedersen, Analysansvarig
Tel. 031-338 32 30
E-post analys@micans.se

Microbial Analytics Sweden AB | Bruksgatan 17, 435 35 Mölnlycke
Tel 031 338 32 30 | www.micans.se

Resultaten gäller endast för de analyserade proverna.
Denna rapport får endast återges i sin helhet.

PROVSVAR

Typnings svar

Micans
Karsten Pedersen
Mölnlycke Fabriker 9
435 35 Mölnlycke

Micans nr. L190XXX-T
Utfärdat datum 2019-08-30

Provtyp^k Tappvarmvatten, ospolat
Provplats^k Storgatan 1
Prov märkt^k Handfat, våning 1
Provtagare^k Sven Svensson
Provtagningsdatum^k 2019-08-29 10:00
Ankomstdatum 2019-08-30 09:00
Analysdatum 2019-09-09 10:00

*Typningsresultat

	Resultat	Metodreferens
<i>L. pneumophila</i> serogrupp 1	Positivt	Latexagglutination (Oxoid)
<i>L. pneumophila</i> serogrupp 2-14	Negativt	
<i>Legionella</i> species ¹	Negativt	

*Akrediterad analys

Resultaten gäller för provet när det ankommit till laboratoriet.

^k = Uppgifter som lämnats av kund.

Kommentar

¹Detekterar Legionella inom följande arter och serogrupper:

L. longbeachae 1 och 2
L. bozemanii 1 och 2
L. dumoffii
L. gormanii
L. jordanis
L. micdadei
L. anisa

Analysansvarig

Andreas Bengtsson, Mikrobiolog
Tel. 031-338 32 30
E-post analys@micans.se

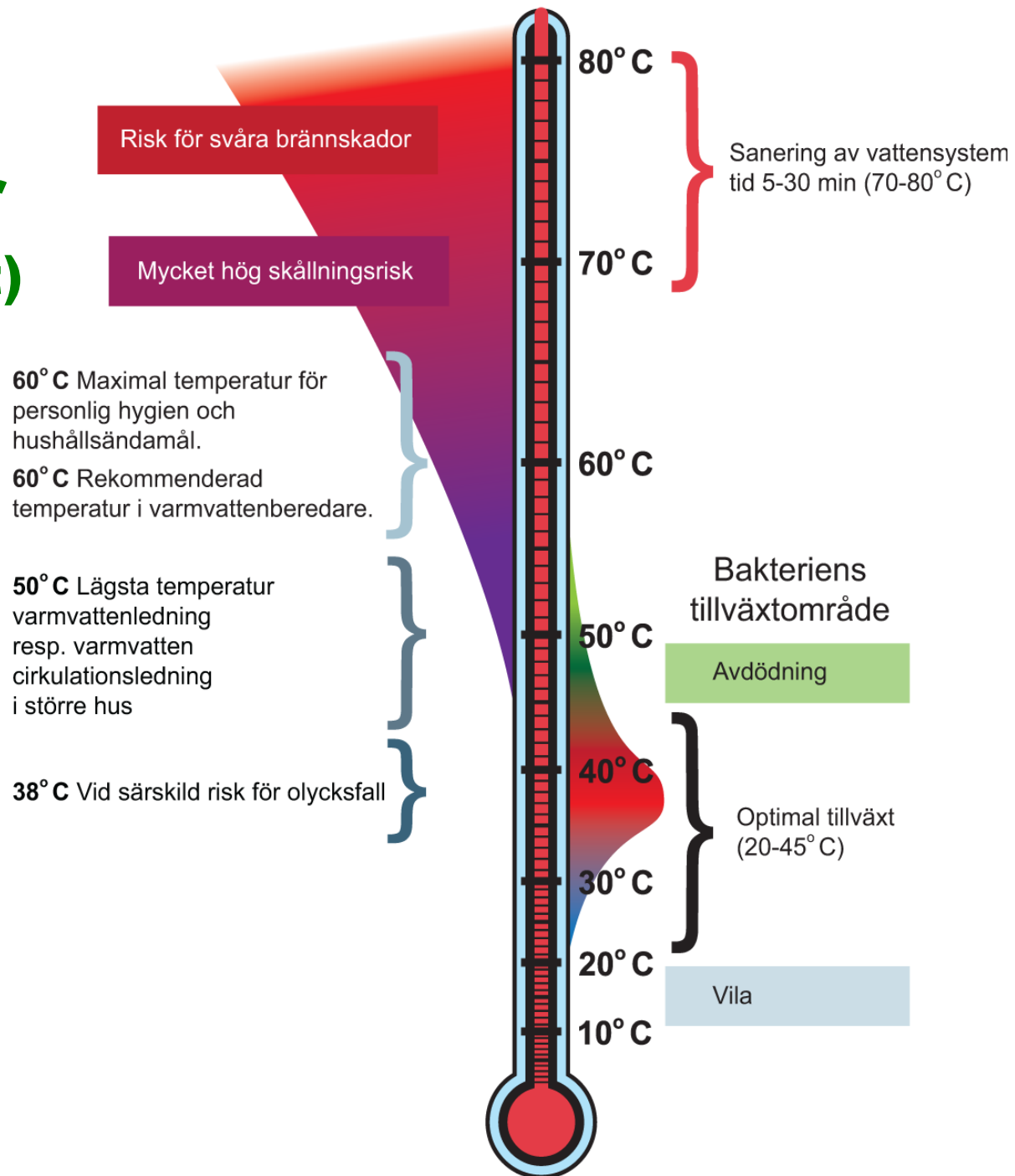
Resultaten gäller endast för de analyserade proverna.
Denna rapport får endast återges i sin helhet.

Erfarenheter

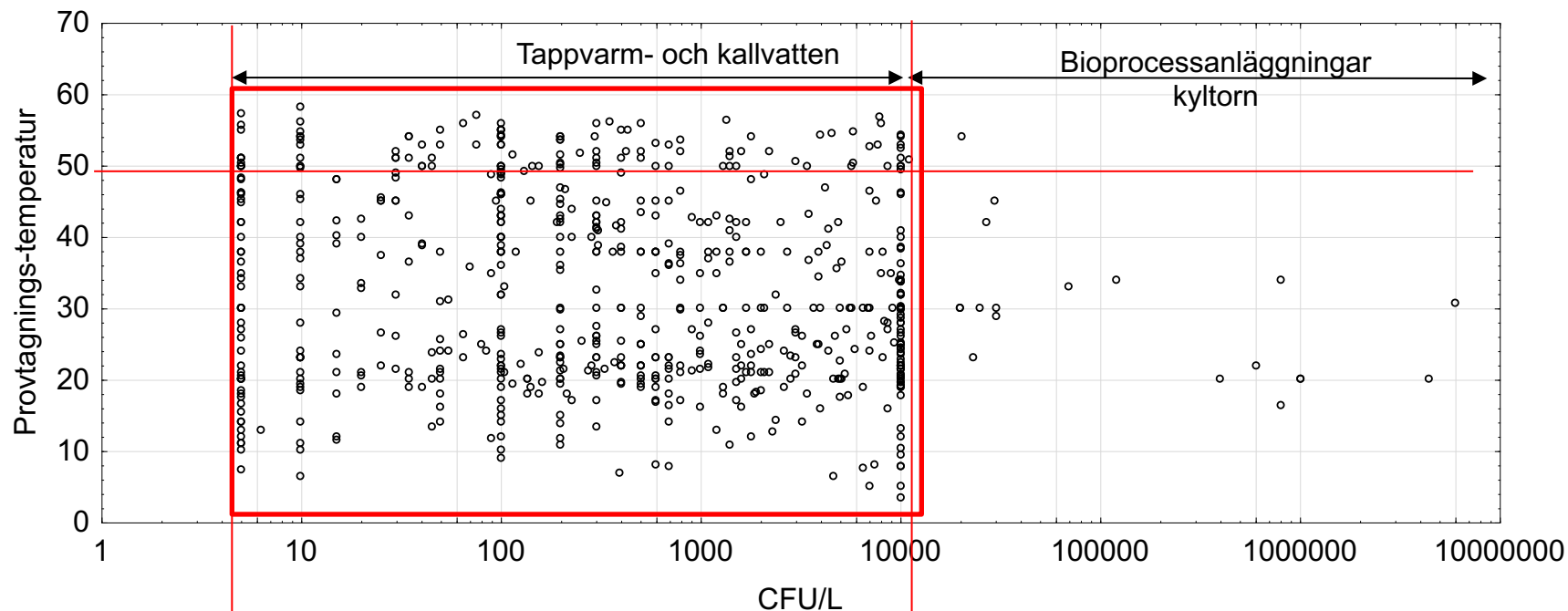
- Något om temperatur
- Legionella, biofilmer, amöbor och assimilerbart organiskt kol (AOC)

Temperatur

(fig. från Boverket)



Provtagningsstemperatur (angiven av provtagare)

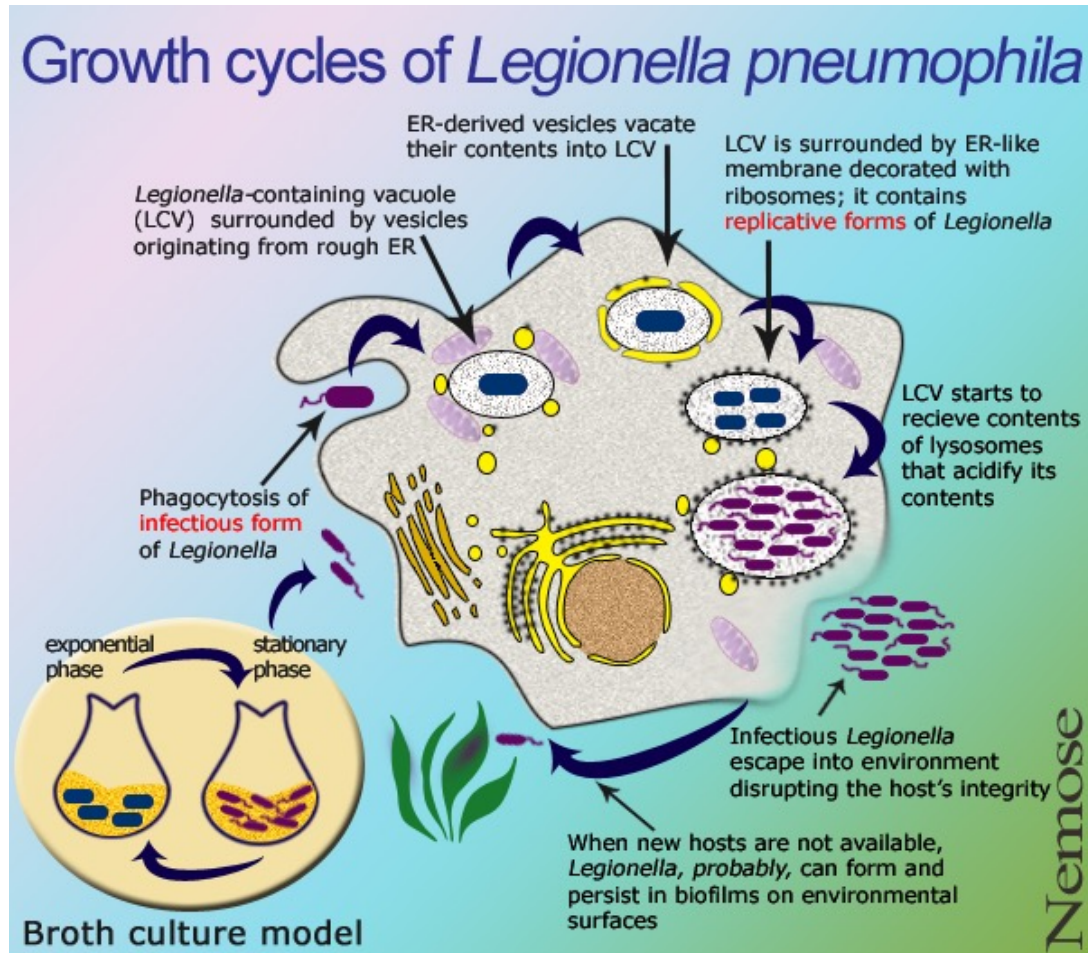


Detektionsgräns
<5 cfu/L

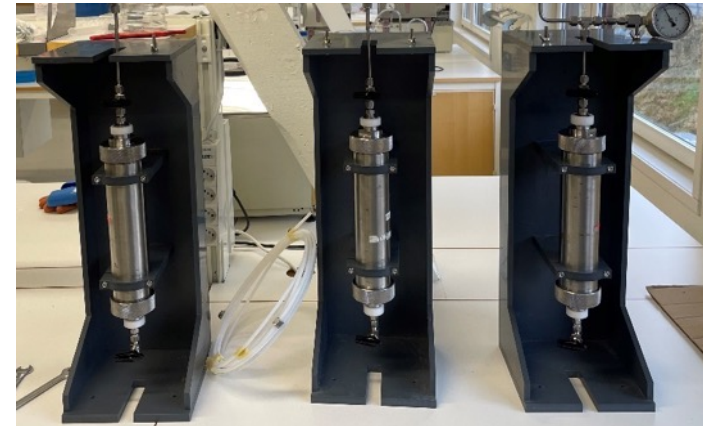
Detektionsgräns
>10 000 cfu/L

Från 25 till 37%
Legionella påvisad
mellan 2018 - 2022

Legionella kan växa som en parasit inuti amöbor i biofilmer



Biofilmreaktor

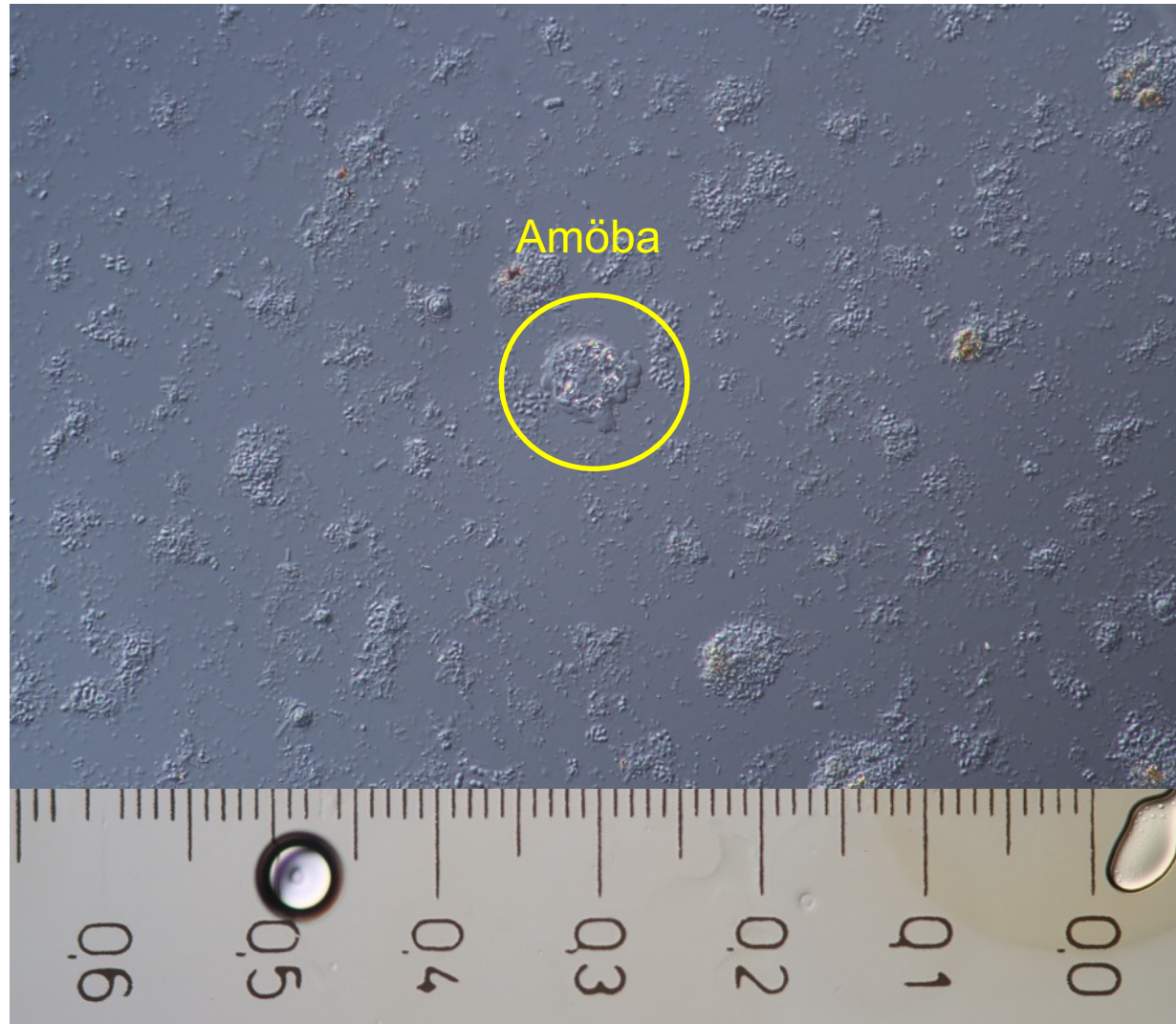


Varmvatten hos Micans

- Biofilmer påvisade:
 - Nästa bild
- Halt assimilerbart organisk kol (AOC):
 - 30 µg acetat-C/L (under 10 anses bra)
- Legionella påvisad:
 - 3000 cfu/L

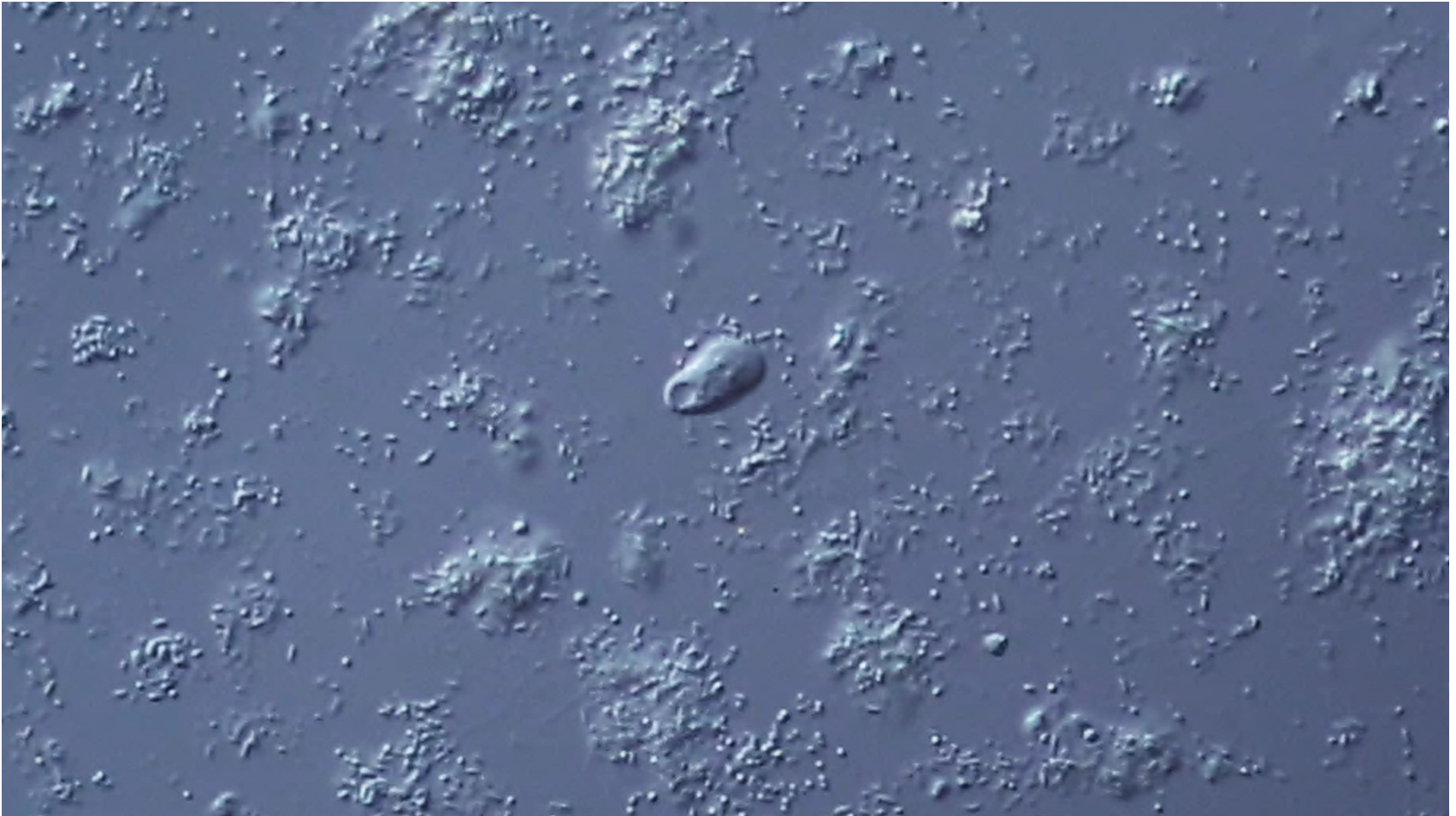
- Amöbor??

Biofilm i Micans varmvatten

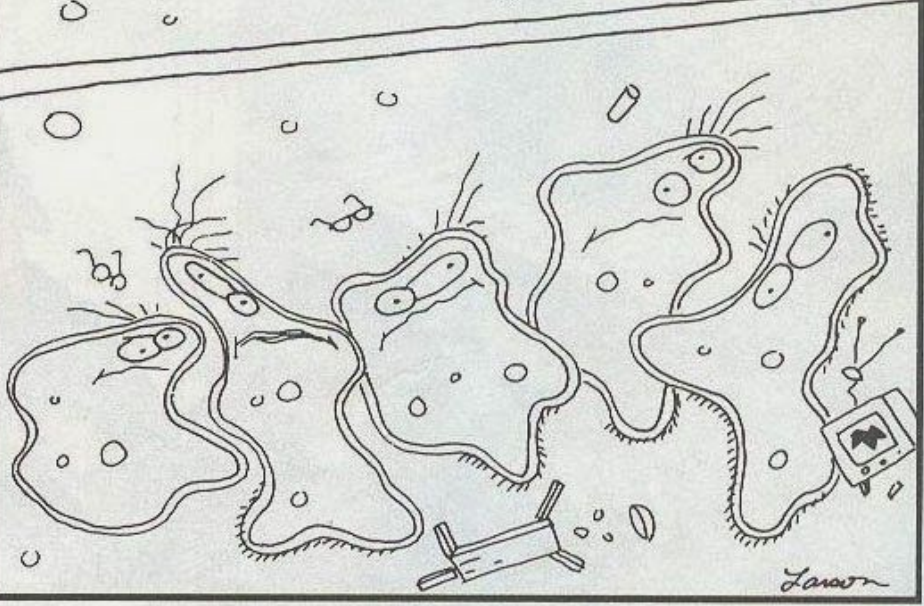
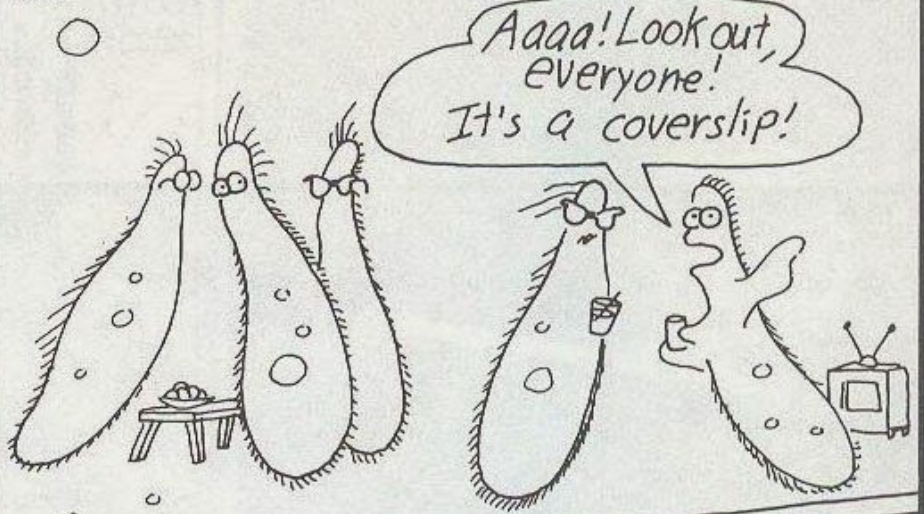


10 µm (0.01 mm) mellan skalstrecken

Amöba som äter bakterier hos Micans



1986



Life on a microscope slide

Vattenkvalite (AOC) och förekomst av Legionella

- Biofilmernas bakterier och protozoer tillväxer och utvecklas i förhållande till tillgängligt AOC
 - Amöbor lever av bakterier i biofilmer
 - Legionella förökar sig i amöbor
-
- **Hypotes: Det kan finnas en koppling mellan halt AOC och förekomst av Legionella i tappvatten**

KVALITETS- OCH MILJÖLEDNINGSSYSTEM, ACKREDITERING

Microbial Analytics Sweden AB är certifierat enligt ISO 9001:2015 och ISO 14001:2015, certifikat 1565 från AAA Certification AB och ackrediterat för miljöanalys av Legionella enligt ISO 17025:2017 av Swedac, Styrelsen för ackreditering och teknisk kontroll, ackrediteringsnummer: 10351. Se mer här: www.micans.se/kvalitet-och-miljo



Ackred. nr. 10351
Provning
ISO/IEC 17025

