

DIN EN ISO 11731

ICS 07.100.20

Ersatz für
DIN EN ISO 11731-2:2008-06**Wasserbeschaffenheit –
Zählung von Legionellen (ISO 11731:2017);
Deutsche Fassung EN ISO 11731:2017**Water quality –
Enumeration of Legionella (ISO 11731:2017);
German version EN ISO 11731:2017Qualité de l'eau –
Dénombrement des Legionella (ISO 11731:2017);
Version allemande EN ISO 11731:2017

Gesamtumfang 50 Seiten

DIN-Normenausschuss Wasserwesen (NAW)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (EN ISO 11731:2017) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 147 „Water quality“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 230 „Wasseranalytik“ erarbeitet, dessen Sekretariat von DIN (Deutschland) gehalten wird.

Das zuständige deutsche Gremium ist der Unterausschuss NA 119-01-03-03 UA „Mikrobiologie“ des Arbeitsausschusses NA 119-01-03 AA „Wasseruntersuchung“ im DIN-Normenausschuss Wasserwesen (NAW).

Bezeichnung des Verfahrens:

Zählung von Legionellen (K 23):

Verfahren DIN EN ISO 11731 — K 23

Für die in diesem Dokument zitierten internationalen Dokumente wird im Folgenden auf die entsprechenden deutschen Dokumente hingewiesen:

ISO 3696	siehe	DIN ISO 3696
ISO 8199	siehe	DIN EN ISO 8199
ISO 11133	siehe	DIN EN ISO 11133
ISO 19458	siehe	DIN EN ISO 19458

Änderungen

Gegenüber DIN EN ISO 11731-2:2008-06 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) die Verfahren nach ISO 11731:1998 und EN ISO 11731:2008 wurden in diesem Dokument zusammengefasst und überarbeitet, weitere Nährmedien und Bestätigungsverfahren (siehe Anhänge) wurden aufgenommen, um den erweiterten Anwendungsbereich abzudecken;
- b) der Anwendungsbereich umfasst nun alle Arten von Wasser einschließlich Trinkwasser, Brauchwasser, Abwasser und natürliche Gewässer sowie wasserhaltige Matrices, z. B. Biofilme, Sedimente usw.;
- c) Legionellen in der Wasserprobe werden abhängig von der Herkunft/den Eigenschaften der Probe entweder durch Membranfiltration konzentriert, verdünnt oder direkt ausplattiert;
- d) in Anhang J ist eine Entscheidungsmatrix zur Auswahl des geeigneten Verfahrens für die jeweilige Probe festgelegt;
- e) Proben, die voraussichtlich eine hohe Anzahl von Legionellen enthalten, z. B. während der Untersuchung eines Ausbruchs, können mit oder ohne Konzentrierungsschritte bearbeitet werden;
- f) zur Reduzierung von Störungen können Anteile der Proben der Hitze- oder Säurebehandlung oder einer Kombination aus beiden Behandlungen unterzogen werden;
- g) die Norm wurde redaktionell überarbeitet.

Frühere Ausgaben

DIN EN ISO 11731-2: 2008-06

Es ist erforderlich, bei den Untersuchungen nach dieser Norm Fachleute oder Facheinrichtungen einzuschalten und bestehende Sicherheitsvorschriften zu beachten.

Bei Anwendung der Norm ist im Einzelfall je nach Aufgabenstellung zu prüfen, ob und inwieweit die Festlegung von zusätzlichen Randbedingungen erforderlich ist.

Die vorliegende Norm enthält das vom DIN-Normenausschuss Wasserwesen (NAW) und von der Wasserchemischen Gesellschaft – Fachgruppe in der Gesellschaft Deutscher Chemiker (GDCh) – gemeinsam erarbeitete Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung:

Zählung von Legionellen (K 23).

Die als DIN-Normen veröffentlichten Deutschen Einheitsverfahren sind bei der Beuth Verlag GmbH einzeln oder zusammengefasst erhältlich. Außerdem werden die genormten Deutschen Einheitsverfahren in der Loseblattsammlung „Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung“ gemeinsam von der Beuth Verlag GmbH und der Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA publiziert.

Normen oder Norm-Entwürfe mit dem Gruppentitel „*Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung*“ sind in folgende Gebiete (Haupttitel) aufgeteilt:

Allgemeine Angaben (Gruppe A)

Sensorische Verfahren (Gruppe B)

Physikalische und physikalisch-chemische Kenngrößen (Gruppe C)

Anionen (Gruppe D)

Kationen (Gruppe E)

Gemeinsam erfassbare Stoffgruppen (Gruppe F)

Gasförmige Bestandteile (Gruppe G)

Summarische Wirkungs- und Stoffkenngrößen (Gruppe H)

Mikrobiologische Verfahren (Gruppe K)

Testverfahren mit Wasserorganismen (Gruppe L)

Biologisch-ökologische Gewässeruntersuchung (Gruppe M)

Einzelkomponenten (Gruppe P)

Schlamm und Sedimente (Gruppe S)

Suborganismische Testverfahren (Gruppe T)

Über die bisher erschienenen Teile dieser Normen gibt die Geschäftsstelle des Normenausschusses Wasserwesen (NAW) im DIN Deutsches Institut für Normung e.V., Telefon 030 2601-2448, oder die Beuth Verlag GmbH, 10772 Berlin (Hausanschrift: Am DIN-Platz, Burggrafenstr. 6, 10787 Berlin), Auskunft.

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN EN ISO 8199, *Wasserbeschaffenheit — Allgemeine Anleitung zur Zählung von Mikroorganismen durch Kulturverfahren*

DIN EN ISO 11133, *Mikrobiologie von Lebensmitteln, Futtermitteln und Wasser — Vorbereitung, Herstellung, Lagerung und Leistungsprüfung von Nährmedien*

DIN EN ISO 19458, *Wasserbeschaffenheit — Probenahme für mikrobiologische Untersuchungen*

DIN ISO 3696, *Wasser für analytische Zwecke — Anforderungen und Prüfungen*

Deutsche Fassung

Wasserbeschaffenheit —
Zählung von Legionellen
(ISO 11731:2017)

Water quality —
Enumeration of Legionella
(ISO 11731:2017)

Qualité de l'eau —
Dénombrement des Legionella
(ISO 11731:2017)

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 12. Februar 2017 angenommen.

Die CEN-Mitglieder sind gehalten, die CEN/CENELEC-Geschäftsordnung zu erfüllen, in der die Bedingungen festgelegt sind, unter denen dieser Europäischen Norm ohne jede Änderung der Status einer nationalen Norm zu geben ist. Auf dem letzten Stand befindliche Listen dieser nationalen Normen mit ihren bibliographischen Angaben sind beim CEN-CENELEC-Management-Zentrum oder bei jedem CEN-Mitglied auf Anfrage erhältlich.

Diese Europäische Norm besteht in drei offiziellen Fassungen (Deutsch, Englisch, Französisch). Eine Fassung in einer anderen Sprache, die von einem CEN-Mitglied in eigener Verantwortung durch Übersetzung in seine Landessprache gemacht und dem Management-Zentrum mitgeteilt worden ist, hat den gleichen Status wie die offiziellen Fassungen.

CEN-Mitglieder sind die nationalen Normungsinstitute von Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, der ehemaligen jugoslawischen Republik Mazedonien, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, den Niederlanden, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Rumänien, Schweden, der Schweiz, Serbien, der Slowakei, Slowenien, Spanien, der Tschechischen Republik, der Türkei, Ungarn, dem Vereinigten Königreich und Zypern.



EUROPÄISCHES KOMITEE FÜR NORMUNG
EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION
COMITÉ EUROPÉEN DE NORMALISATION

CEN-CENELEC Management-Zentrum: Rue de la Science 23, B-1040 Brüssel

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort.....	4
Vorwort.....	5
Einleitung.....	6
1 Anwendungsbereich.....	7
2 Normative Verweisungen.....	7
3 Begriffe.....	7
4 Grundlage des Verfahrens.....	8
4.1 Allgemeines.....	8
4.2 Untersuchung.....	8
4.3 Bestätigung.....	8
5 Geräte und Glasgeräte.....	8
6 Nährmedien und Reagenzien.....	9
7 Probenahme.....	10
8 Durchführung.....	11
8.1 Proben.....	11
8.2 Aufkonzentrierung von Wasserproben.....	11
8.2.1 Allgemeines.....	11
8.2.2 Membranfiltration und direktes Aufbringen des Membranfilters auf Nährmedien.....	11
8.2.3 Membranfiltration mit anschließendem Abschwemmen.....	11
8.3 Vorbehandlung der Probe.....	12
8.3.1 Wärmebehandlung.....	12
8.3.2 Säurebehandlung.....	12
8.4 Kultivierung.....	13
8.4.1 Allgemeines.....	13
8.4.2 Proben mit einer hohen Konzentration an <i>Legionella</i> -Spezies und einer geringen Konzentration an störenden Mikroorganismen.....	13
8.4.3 Proben mit einer geringen Konzentration von <i>Legionella</i> -Spezies und einer geringen Konzentration von störenden Mikroorganismen.....	13
8.4.4 Proben mit einer hohen Konzentration an störenden Mikroorganismen.....	13
8.4.5 Proben mit einer extrem hohen Konzentration an störenden Mikroorganismen.....	14
8.4.6 Bebrütung.....	14
8.4.7 Untersuchung der Platten.....	14
8.5 Bestätigung verdächtiger <i>Legionella</i> -Kolonien auf Nährmedien: BCYE-Agar und BCYE-cys Agar.....	15
9 Angabe der Ergebnisse.....	15
10 Untersuchungsbericht.....	16
11 Qualitätssicherung.....	17
11.1 Allgemeines.....	17
11.2 Leistungsprüfung von Nährmedien für <i>Legionella</i>	17
11.3 Vorbereitung der Arbeitskulturen und Testsuspension für die Leistungsprüfung.....	17
Anhang A (informativ) <i>Legionella</i> -Spezies.....	19

Anhang B (normativ) Nährmedium	21
Anhang C (normativ) Verdünnungslösungen	27
Anhang D (normativ) Säurelösung.....	28
Anhang E (informativ) Abschaben oder Abreiben der Bakterien von den Membranfiltern	29
Anhang F (informativ) Zentrifugationsverfahren	30
Anhang G (informativ) Indirekter Immunfluoreszenz-Antikörpertest für die Identifizierung von <i>Legionella</i>-Spezies	31
Anhang H (informativ) Verfahrenskennndaten	34
Anhang I (informativ) Vorbehandlung von wasserhaltigen Matrices	38
Anhang J (normativ) Entscheidungsmatrix.....	39
Literaturhinweise	46

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (EN ISO 11731:2017) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 147 „Water quality“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 230 „Wasseranalytik“ erarbeitet, dessen Sekretariat von DIN gehalten wird.

Diese Europäische Norm muss den Status einer nationalen Norm erhalten, entweder durch Veröffentlichung eines identischen Textes oder durch Anerkennung bis Dezember 2017, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis Dezember 2017 zurückgezogen werden.

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente dieses Dokuments Patentrechte berühren können. CEN [und/oder CENELEC] ist/sind nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren.

Dieses Dokument ersetzt EN ISO 11731-2:2008.

Entsprechend der CEN-CENELEC-Geschäftsordnung sind die nationalen Normungsinstitute der folgenden Länder gehalten, diese Europäische Norm zu übernehmen: Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, Niederlande, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Rumänien, Schweden, Schweiz, Serbien, Slowakei, Slowenien, Spanien, Tschechische Republik, Türkei, Ungarn, Vereinigtes Königreich und Zypern.

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO 11731:2017 wurde von CEN als EN ISO 11731:2017 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

Vorwort

ISO (die Internationale Organisation für Normung) ist eine weltweite Vereinigung nationaler Normungsorganisationen (ISO-Mitgliedsorganisationen). Die Erstellung von Internationalen Normen wird üblicherweise von Technischen Komitees von ISO durchgeführt. Jede Mitgliedsorganisation, die Interesse an einem Thema hat, für welches ein Technisches Komitee gegründet wurde, hat das Recht, in diesem Komitee vertreten zu sein. Internationale staatliche und nichtstaatliche Organisationen, die in engem Kontakt mit ISO stehen, nehmen ebenfalls an der Arbeit teil. ISO arbeitet bei allen elektrotechnischen Themen eng mit der Internationalen Elektrotechnischen Kommission (IEC) zusammen.

Die Verfahren, die bei der Entwicklung dieses Dokuments angewendet wurden und die für die weitere Pflege vorgesehen sind, werden in den ISO/IEC-Direktiven, Teil 1 beschrieben. Es sollten insbesondere die unterschiedlichen Annahmekriterien für die verschiedenen ISO Dokumentenarten beachtet werden. Dieses Dokument wurde in Übereinstimmung mit den Gestaltungsregeln der ISO/IEC-Direktiven, Teil 2 erarbeitet (siehe www.iso.org/directives).

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente dieses Dokuments Patentrechte berühren können. ISO ist nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren. Details zu allen während der Entwicklung des Dokuments identifizierten Patentrechten finden sich in der Einleitung und/oder in der ISO-Liste der empfangenen Patenterklärungen (siehe www.iso.org/patents).

Jeder in diesem Dokument verwendete Handelsname dient nur zur Unterrichtung der Anwender und bedeutet keine Anerkennung.

Eine Erläuterung zum freiwilligen Charakter von Normen, der Bedeutung ISO-spezifischer Begriffe und Ausdrücke in Bezug auf Konformitätsbewertungen sowie Informationen darüber, wie ISO die Grundsätze der Welthandelsorganisation (WTO) hinsichtlich technischer Handelshemmnisse (TBT) berücksichtigt, enthält der folgende Link: www.iso.org/iso/foreword.html.

Das für dieses Dokument verantwortliche Komitee ist ISO/TC 147 „*Water quality*“, Subkomitee SC 4 „*Microbiological methods*“.

Diese zweite Ausgabe von ISO 11731 ersetzt die erste Ausgabe von ISO 11731:1998 und ISO 11731-2:2004, die technisch überarbeitet wurden.

Einleitung

Nach dem ersten bekannten Ausbruch der Legionärskrankheit im Jahr 1976 wurde das isolierte Bakterium *Legionella pneumophila* benannt. Legionellen werden weit verbreitet in der natürlichen und künstlichen aquatischen Umwelt, in Böden sowie in Kompost gefunden und können zur Legionellose führen. Legionellen können intrazellulär in Protozoen wie *Acanthamoeba castellanii*, *Hartmannella*-Spezies oder *Naegleria*-Spezies wachsen. Mindestens 61 verschiedene *Legionella*-Spezies wurden beschrieben. Es wurde berichtet, dass bei 26 von diesen Spezies einige Stämme Menschen infizieren. *Legionella pneumophila* kann in mindestens 15 verschiedene Serogruppen unterteilt werden; neun andere Spezies können ebenfalls in mindestens zwei getrennte Serogruppen unterteilt werden. Die Überwachung der Legionellen ist aus Gründen der öffentlichen Gesundheit wichtig, um Quellen in der Umwelt zu identifizieren, die ein Risiko hinsichtlich der Legionellose darstellen können, wie z.B. Verdunstungskühltürme, Warm- und Kaltwasserverteilungssysteme in Gebäuden und in den dazugehörigen Einrichtungen, wie z.B. Dental-Einheiten, Klimaanlage, Spa-Pools usw. Von Bedeutung ist die Überwachung auch für die Validierung von Kontrollmaßnahmen und für die laufende Verifizierung, ob die Kontrollen wirksam bleiben.

WARNUNG — Anwender dieses Dokumentes sollten mit der üblichen Laborpraxis vertraut sein. Dieses Dokument gibt nicht vor, alle unter Umständen mit der Anwendung des Verfahrens verbundenen Sicherheitsaspekte anzusprechen. Es liegt in der Verantwortung des Arbeitgebers geeignete Sicherheits- und Schutzmaßnahme zu schaffen und sicherzustellen, dass diese mit nationalen Festlegungen übereinstimmen.

WICHTIG — Es ist unbedingt erforderlich, bei Untersuchungen nach diesem Dokument Fachleute oder Facheinrichtungen einzuschalten.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt Kultivierungsverfahren zur Isolierung von *Legionella* und Abschätzung ihrer Anzahl in Wasserproben fest.

Diese Verfahren sind für alle Arten von Wasser, einschließlich Trinkwasser, Brauchwasser, Abwasser und natürliche Gewässer, anwendbar. Diese Verfahren können für wasserhaltige Matrices, z. B. Biofilme, Sedimente usw., verwendet werden.

Nicht alle *Legionella*-Spezies sind kultivierbar; deshalb werden mit den in dem vorliegenden Dokument beschriebenen Verfahren nicht alle Spezies von *Legionella* gefunden.

2 Normative Verweisungen

Die folgenden Dokumente werden im Text in solcher Weise in Bezug genommen, dass einige Teile davon oder ihr gesamter Inhalt Anforderungen des vorliegenden Dokuments darstellen. Bei datierten Verweisungen gilt nur die in Bezug genommene Ausgabe. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe des in Bezug genommenen Dokuments (einschließlich aller Änderungen).

ISO 3696, *Water for analytical laboratory use — Specification and test methods*

ISO 7704, *Water quality — Evaluation of membrane filters used for microbiological analyses*

ISO 8199, *Water quality — General guidance on the enumeration of micro-organisms by culture*

ISO 11133, *Microbiology of food, animal feed and water — Preparation, production, storage and performance testing of culture media*

ISO 19458, *Water quality — Sampling for microbiological analysis*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die folgenden Begriffe.

ISO und IEC stellen terminologische Datenbanken für die Verwendung in der Normung unter den folgenden Adressen bereit:

— ISO Online Browsing Platform: unter <http://www.iso.org/obp>

— IEC Electropedia: unter <http://www.electropedia.org/>

3.1

Legionella

Gattung von Mikroorganismen, die normalerweise auf gepuffertem Aktivkohle-Hefeextrakt-Agar (BCYE-Agar, en: buffered charcoal yeast extract agar) mit L-Cystein und Eisen(III)-Salzen wachstumsfähig sind

Anmerkung 1 zum Begriff: Für eine detailliertere Beschreibung der *Legionella*-Spezies siehe Anhang A.

4 Grundlage des Verfahrens

4.1 Allgemeines

Legionella in der Wasserprobe werden abhängig von der Herkunft/den Eigenschaften der Probe durch Membranfiltration aufkonzentriert, verdünnt oder direkt ausplattiert. Die gewünschte Nachweisgrenze kann in Abhängigkeit von der (inter-)nationalen Gesetzgebung und dem Grund für die Probenahme oder Untersuchung variieren. Proben, die voraussichtlich eine hohe Anzahl von Legionellen enthalten, beispielsweise diejenigen, die während der Untersuchung eines Ausbruchs entnommen werden, können mit und/oder ohne Konzentrierungsschritte bearbeitet werden. Zur Reduzierung des Wachstums der ebenfalls konzentrierten Nicht-Zielbakterien, die die Wiederfindung der Zielorganismen, Legionellen, stören können, werden Teilproben auch einer Wärmebehandlung, einer Säurebehandlung oder einer Kombination aus beiden Behandlungen unterzogen.

Eine Verdünnung ist notwendig, wenn hohe Konzentrationen von *Legionella* und/oder andere Bakterien erwartet werden. Einzelne Anteile der verdünnten Probe sollten vorbehandelt werden; ein Anteil mit Wärme, ein zweiter mit Säurelösung oder im Fall von extrem kontaminierten Proben mit einer Kombination von Säurelösung und Wärme vor der Kultivierung auf Selektivmedien.

Behandelte und/oder unbehandelte Anteile der Probe werden auf Platten des gewählten selektiven Nährmediums für *Legionella* übertragen und bebrütet.

ANMERKUNG Eine mechanische Vorbehandlung der Probe kann die Wiederfindung von Legionellen verbessern.

4.2 Untersuchung

Nach der Bebrütung werden morphologisch charakteristische Kolonien auf dem selektiven Nährmedium als verdächtige *Legionella* betrachtet.

4.3 Bestätigung

Verdächtige Kolonien werden durch Subkultivierung mit Nachweis des L-Cystein- und Eisen(III)-Bedarfs als *Legionella* bestätigt.

ANMERKUNG Sofern die Identifizierung von Spezies und Serotypen gefordert wird, werden weitere Untersuchungen erforderlich (siehe Anhang G). Diese Untersuchungen sind nicht Teil der in diesem Dokument beschriebenen Standardverfahren.

5 Geräte und Glasgeräte

Übliche Laborausrüstung und insbesondere Folgendes:

5.1 Sterile Petrischalen.

5.2 Brutschrank, auf (36 ± 2) °C thermostatisierbar.

5.3 Ultraviolett-Lampe, abgestrahltes Licht mit einer Wellenlänge von (360 ± 20) nm.

5.4 Membranfilter-Ausrüstung, geeignet zum Filtrieren von Wasservolumina von 10 ml bis 1 000 ml.

5.5 Membranfilter.

5.5.1 Membranfilter für Konzentration und Elution, Membranfilter aus Polycarbonat oder Polyethersulfon, Durchmesser 47 mm bis 142 mm mit einer Nenngröße der Poren von 0,2 µm; siehe [6]. Diese Membranfilter-Typen werden zur Konzentrierung mit anschließendem Abschwemmen verwendet.

5.5.2 Membranfilter für die direkte Platzierung auf Nährmedien, Membranfilter aus Cellulosenitrat oder gemischten Celluloseestern, Durchmesser 47 mm bis 50 mm mit Nenngröße der Poren 0,2 µm oder 0,45 µm. Diese Membranfilter-Typen werden für das direkte Auflegen auf Nährmedien nach dem Filtrieren verwendet. Die Filter müssen vor der Anwendung nach ISO 7704 geprüft werden.

ANMERKUNG Schwarze Membranfilter geben einen besseren Kontrast zu den weißen *Legionella*-Kolonien als hellere Membranfilter.

5.6 pH-Messgerät, mit einer Fehlergrenze von $\pm 0,1$ bei 20 °C bis 25 °C.

5.7 Vortexmixer.

5.8 Ultraschall-Wasserbad, geeignet zum Sicherstellen, dass der Füllstand der Verdünnungslösung, die das Membranfilter bedeckt, unter dem Wasserpegel im Wasserbad liegt.

5.9 Wasserbad, auf (50 ± 1) °C thermostatisierbar.

5.10 Glaswaren, sterilisiert nach ISO 8199.

5.11 Präpariermikroskop, stereoskopisch, mit einer mindestens 4-fachen Vergrößerung und schräg einfallender Auflichtbeleuchtung.

ANMERKUNG Eine Handlupe (Vergrößerung mindestens 4-fach) kann ebenfalls verwendet werden.

5.12 desinfizierte Pinzetten, für die Handhabung der Membranfilter.

ANMERKUNG Üblicherweise werden Pinzetten mit abgerundeten Enden verwendet, um die Membranen bei der Handhabung nicht zu beschädigen.

5.13 Steriler Behälter mit Schraubverschluss, mit oder ohne sterile Glasperlen. Um eine maximale Ablösung der Legionellen vom Membranfilter sicherzustellen, können sterile Glasperlen (Durchmesser 2 mm bis 3 mm) in den sterilen Behälter gegeben werden. Es werden ausreichend sterile Glasperlen in den sterilen Behälter gegeben, um den Boden des Behälters zu bedecken.

6 Nährmedien und Reagenzien

Zur Herstellung von Nährmedien und Reagenzien sind, wenn nicht anders angegeben, Chemikalien des Reinheitsgrades „zur Analyse“ zu verwenden (siehe Anmerkung). Die Nährmedien und Reagenzien werden nach den in den Anhängen B, C und D angegebenen Anweisungen hergestellt. Nährmedien sind mit destilliertem oder demineralisiertem Wasser, das frei von Substanzen ist, die das Wachstum von Mikroorganismen unter den Untersuchungsbedingungen beeinflussen könnten, herzustellen. Das Wasser muss mit den Anforderungen von ISO 3696, Qualität 3, übereinstimmen.

Alternativ sind im Handel erhältliche Nährmedien und Reagenzien zu verwenden, die entsprechend den Anweisungen des Herstellers hergestellt und verwendet werden.

ANMERKUNG Chemikalien eines anderen Reinheitsgrades können verwendet werden, sofern gezeigt wurde, dass sie die gleiche Leistungsfähigkeit in der Untersuchung aufweisen.

6.1 Nährmedium.

Siehe Anhang B.

6.1.1 Gepufferter Aktivkohle-Hefeextrakt-Agar (en: Buffered Charcoal Yeast Extract agar, BCYE-Agar).

Siehe B.1.

6.1.2 Gepufferter Aktivkohle-Hefeextrakt-Agar ohne L-Cystein (BCYE-Cys).

Siehe B.2.

ANMERKUNG Blutagar (siehe B.6), Nährstoffagar (siehe B.7) oder Trypton-Soja-Agar (siehe B.8) können statt BCYE-Cys-Agar verwendet werden.

6.1.3 Gepufferter Aktivkohle-Hefeextrakt-Agar mit Selektivsupplementen (BCYE+AB-Agar).

Siehe B.3.

6.1.4 Glycin-Vancomycin-Polymyxin B-Cycloheximid-Agar (GVPC-Agar).

Siehe B.4.

6.1.5 Modifizierter Agar nach Wadowsky und Yee (en: Modified Wadowsky Yee agar, MWY-Agar).

Siehe B.5.

6.2 Verdünnungslösungen.

Siehe Anhang C.

6.2.1 Salzlösung nach Page.

Siehe C.1.

6.2.2 Verdünnte Ringer-Lösung.

Siehe C.2.

6.3 Säurelösung.

Siehe Anhang D.

7 Probenahme

Probenahme, Transport und Lagerung der Proben erfolgen nach ISO 19458. Es ist darauf zu achten, dass die Proben keinen beeinträchtigenden Temperaturbedingungen ausgesetzt werden (z. B. ein Einfrieren oder Überhitzen).

ANMERKUNG Die Verwendung von isolierten Transportbehältnissen ist in dieser Hinsicht hilfreich.

8 Durchführung

8.1 Proben

Aufgrund der komplexen Natur der unterschiedlichen Probenmatrices muss das Labor das geeignete Verfahren für jeden Probentyp bestimmen. Anhang J enthält eine Entscheidungsmatrix, die dabei hilft, das geeignete Verfahren zu bestimmen. Anhang J beschreibt die Anforderungen und liefert zusätzliche Möglichkeiten.

Zur Sicherstellung des Nachweises von Legionellen aus Wasserproben wird in den meisten Fällen ein Konzentrationsverfahren durch Membranfiltration (siehe 8.2.2 oder 8.2.3) erforderlich. Ist die Konzentration der Legionellen voraussichtlich größer als 10^4 KBE/l kann auch das direkte Ausplattieren der nicht konzentrierten Probe durchgeführt werden. Stark kontaminierte Proben werden verdünnt (siehe Anhang C für geeignete Verdünnungslösungen) und vor und nach Vorbehandlung (siehe 8.3) direkt ausplattiert. Die Volumina der verdünnten oder vorbehandelten Proben sind zu dokumentieren, genauso welche Vorbehandlung(en) angewendet wurde(n).

Ist die Anzahl an Legionellen in den vorhandenen Proben nicht bekannt, werden üblicherweise Konzentrationsverfahren durchgeführt. Daher wird das Verfahren aus 8.2.2 oder 8.2.3 befolgt.

8.2 Aufkonzentrierung von Wasserproben

8.2.1 Allgemeines

Hinsichtlich einer allgemeinen Beschreibung des Membranfiltrationsverfahrens siehe ISO 8199. Die Filtration kann durch Vakuum-Filtration oder Überdruck-Filtration erfolgen.

Der Durchfluss sollte so eingestellt werden, dass der vom Hersteller festgelegte Höchstwert für die Filtergröße oder den Filtertyp nicht überschritten wird.

ANMERKUNG Das Verfahren für wasserhaltige Matrices (Abstriche, Sedimente usw.) ist in Anhang I beschrieben.

8.2.2 Membranfiltration und direktes Aufbringen des Membranfilters auf Nährmedien

Die Wasserprobe (ohne Behandlung, nach Säurebehandlung und, falls notwendig, nach Wärmebehandlung) wird über ein Membranfilter aus Cellulosenitrat oder Cellulosemischester (5.5.2) filtriert. Die Säurebehandlung kann auch direkt auf dem Membranfilter im Trichter (siehe 8.3.2) erfolgen. Das filtrierte Volumen hängt vom Partikelgehalt des Wassers oder von der gewünschten Nachweisgrenze ab. Das filtrierte Volumen der Probe muss aufgezeichnet werden. Das Membranfilter wird vorsichtig mit der desinfizierten Pinzette (5.12) vom Filterhalter entfernt und direkt (rechte Seite nach oben) auf den Nährboden gelegt, dabei ist sicherzustellen, dass darunter keine Luftblase eingeschlossen wird.

ANMERKUNG Wenn eine Konzentrierung durch Filtration nicht möglich ist (z. B. aufgrund der großen Menge an Ablagerungen), kann die Probe durch Zentrifugieren (siehe Anhang F) konzentriert werden.

8.2.3 Membranfiltration mit anschließendem Abschwemmen

Die Wasserprobe wird über ein Polycarbonat- oder Polyethersulfon-Membranfilter (5.5.1) filtriert. Das filtrierte Volumen hängt vom Partikelgehalt des Wassers oder von der gewünschten Nachweisgrenze ab. Das filtrierte Volumen der Probe muss aufgezeichnet werden. Das Membranfilter wird mittels desinfizierter Pinzetten vom Ständer entfernt (5.12). Es wird vorsichtig gearbeitet, um den Verlust der verbleibenden Ablagerungen zu vermeiden. Das Membranfilter wird (rechte Seite nach unten) in einen sterilen Behälter mit Schraubverschluss mit oder ohne sterile Glasperlen eingesetzt (5.13). Zum Abschwemmen der Mikroorganismen aus dem Membranfilter werden 5 ml bis 10 ml sterile Verdünnungslösung (siehe Anhang C) oder Probe hinzugegeben und mittels eines Vortexmixers (5.7) mindestens 2 min lang kräftig geschüttelt. Alternativ wird der Behälter (5.13) für eine Zeitdauer in ein Ultraschallbad (5.8) eingelegt, die als optimales