

Undersøgelse for *Legionella* i drikkevand

Dorthe Olsen & Vibeke From Jeppesen
Eurofins Danmark A/S

Linda Bagge
Miljøstyrelsen

Miljøstyrelsen vil, når lejligheden gives, offentliggøre rapporter og indlæg vedrørende forsknings- og udviklingsprojekter inden for miljøsektoren, finansieret af Miljøstyrelsens undersøgelsesbevilling.

Det skal bemærkes, at en sådan offentliggørelse ikke nødvendigvis betyder, at det pågældende indlæg giver udtryk for Miljøstyrelsens synspunkter.

Offentliggørelsen betyder imidlertid, at Miljøstyrelsen finder, at indholdet udgør et væsentligt indlæg i debatten omkring den danske miljøpolitik.

Indhold

FORORD	5
SAMMENFATNING OG KONKLUSIONER	7
SUMMARY AND CONCLUSIONS	9
1 INDLEDNING	11
2 LEGIONELLA	13
2.1 KARAKTERISERING AF <i>LEGIONELLA</i>	13
2.2 SYMPTOMER / KLINISK BILLEDE	13
2.3 VÆKSTBETINGELSER	13
3 FORFORSØG	15
3.1 MATERIALER OG METODER	15
3.1.1 Vandværker til forsøg	15
3.1.2 Prøvetyper	15
3.1.3 Prøvetagning	15
3.1.4 Prøveperiode	16
3.1.5 Analysemetode	16
3.2 RESULTATER	17
3.2.1 Effekt af prøvetagningen	17
3.2.2 Betydning af analysemetode	18
3.3 KONKLUSION	21
4 UDVÆLGELSE AF VANDVÆRKER	23
5 FASTLÆGGELSE AF PRØVETYPER	25
6 METODER	27
6.1 PRØVETAGNING	27
6.2 PRØVEPERIODE	27
6.3 ANALYSEMETODE	27
6.3.1 Vandprøver	28
6.3.2 Biofilm og filtermateriale	28
7 RESULTATER	29
7.1 FOREKOMST AF <i>LEGIONELLA</i> I VANDVÆRKER MED TILHØRENDE LEDNINGSNET	29
8 DISKUSSION	31
9 KONKLUSION	35
10 BAGGRUNDSLITTERATUR	37

Forord

Miljøstyrelsen besluttede i 2001 at undersøge dansk drikkevand for *Legionella*, da der ikke tidligere var lavet en lignende undersøgelse. Screeningen har haft til formål at undersøge hvorvidt - og i givet fald i hvilket niveau - *Legionella* forekommer i drikkevand. Indenfor de sidste 10 år har der været øget fokus på forekomst af *Legionella*, især i varmtvandsystemer på hospitaler og i andre større varmtvandsanlæg fx i beboelsesejendomme, institutioner og virksomheder. Det er kendt, at der findes *Legionella* i mange danske varmtvandsystemer, hvorimod forekomst af *Legionella* i dansk drikkevand kun i begrænset omfang er undersøgt. I en undersøgelse af danske regn- og gråvandsanlæg (Albrechtsen, 1998) blev påvist *Legionella* spp. (kvalitativt i 1 liter vand) i en række prøver. I udlandet er der undersøgt drikkevand, der er indvundet fra overfladevand/brønde (Riffard et al., 2001) med fund af ca. 10^2 - 10^5 *Legionella*/liter.

Nærværende rapport beskriver en screening af dansk drikkevand for *Legionella*. Rapporten indledes med en kort beskrivelse af *Legionella* og derefter en beskrivelse af et forsøg til klarlægning af prøvetagningen samt eventuelle virkninger af de modifikationer med bl.a. større prøvevolumen (10, 50 og 100 liter) og filtrering af vandet i forbindelse med selve prøvetagningen, der er foretaget i forhold til DS 3029 (2001). Herefter beskrives de endelige screeninger af vand fra vandværkerne - hvor afgangsvand fra vandværkerne og tilhørende ledningsnet er undersøgt.

Første del af screeningen er foretaget i slutningen af en lang varm sommer (2002) på 27 vandværker og var herefter tænkt gentaget i en kold periode. Resultaterne viste imidlertid ingen fund af *Legionella* på vandværkerne efter den lange varme periode, der må betragtes som "worst case" i forbindelse med *Legionella*. Derfor blev undersøgelsen på vandværkerne ikke gentaget i en kold periode, men derimod fulgt op af en screening, hvor der blev udtaget vandprøver 37 steder på ledningsnettet.

Der rettes en tak til landsformand for Foreningen af Vandværker i Danmark (FVD), Solveg Nilsson og sekretær i Dansk Vand og Spildevand (DANVA), Thorlei Thomsen for hjælp med udvælgelsen af vandværkerne og rettes en tak for venlig deltagelse til de udvalgte vandværker.

Rapporten er udarbejdet af:

Dorthe Olsen, Eurofins Danmark A/S
Linda Bagge, Miljøstyrelsen
Vibeke From Jeppesen, Eurofins Danmark A/S

Følgegruppen for projektet udgøres af:

Linda Bagge, Miljøstyrelsen
Susanne Rasmussen, Miljøstyrelsen
Klaus Kolind-Hansen, Dansk Vand og Spildevand (DANVA)
Solveg Nilsson, Foreningen af Vandværker i Danmark (FVD)
Søren Lind, Københavns Energi
Hans-Jørgen Albrechtsen, Miljø & Ressourcer DTU

Sammenfatning og konklusioner

Miljøstyrelsen besluttede i 2001 at undersøge dansk drikkevand for *Legionella*, da der ikke tidligere var lavet en lignende undersøgelse. Denne rapport beskriver, hvorledes dansk drikkevand er screenet for *Legionella*. Screeningen har haft til formål at undersøge hvorvidt - og i givet fald i hvilket niveau - *Legionella* forekommer i drikkevand dels for at bekræfte teorien om, at *Legionella* ikke forekommer i dansk drikkevand i et niveau, der udgør nogen sundhedsrisiko og dels for at se, om drikkevand er en mulig kilde til forekomst af *Legionella* i varmtvandssystemerne.

Undersøgelsen blev indledt med et forforsøg på tre vandværker. Formålet var at fastlægge fremgangsmåden ved prøvetagningen samt at vurdere de eventuelle virkninger af de indførte modifikationer med bl.a. større prøvevolumen (10, 50 og 100 liter) og filtrering af vandet i forbindelse med selve prøvetagningen, der er foretaget i forhold til DS 3029:2001 (Miljøundersøgelse – Bestemmelse af legionella – Opkoncentrering og kolonitælling på fast substrat – Overfladeudsæd). Prøvetagningsudstyret er udviklet hos Eurofins Danmark A/S. På baggrund af forforsøget blev det besluttet, at der til den endelige screening skulle filtreres 10 liter afgangsvand, mens det ikke var muligt at udtage eller filtrere tilstrækkelige mængder råvand fra vandværkerne. Det var endvidere vigtigt at anvende den korrekte filtertype, (0,45 µm mixed esters af cellulose: nitrocellulose og cellulose acetat) for at kunne filtrere vandet, som ikke kunne trænge igennem et 0,45 µm filter af cellulose-nitrat.

Der blev ikke påvist *Legionella* i prøverne fra de tre vandværker. På trods af det store prøvevolumen var følgefloraen ikke så kraftig, at den gav problemer i form af overvoksning og skygge for *Legionella* i forbindelse med aflæsning af pladerne. Det gav ikke nogen positiv effekt i forhold til evt. stressede *Legionella*, at lade prøven henstå til restituering ved stuetemperatur i 48 timer, idet opformering af følgeflora her gjorde det vanskeligt at skelne *Legionella*-kolonier fra resten af følgefloraen. MWY-agar (Modified Wadowsky Yee-agar) blev testet parallelt med GVPC-agar (Buffered Charcoal Yeast Extract agar med selektivt supplement) for at vurdere, om det ene substrat synes bedre end det andet mht. selektivitet og evt. påvisning af *Legionella*. Det var ikke muligt at konkludere entydigt på baggrund af forforsøget, og der blev derfor kørt parallelt med de to agartyper i screeningen af vandværkerne.

De endelige screeninger af drikkevand foregik på 27 vandværker – hvor afgang vandværk og ledningsnettet (to forskellige ledningsnet-prøver fra to af vandværkerne) blev undersøgt. Hertil kom analyse af vand fra ledningsnet fra otte andre vandværker. Screeningen på vandværkerne foregik i slutningen af en lang varm sommer (2002) mens screeningen af ledningsnettet foregik i en kold periode (2003). Der blev undersøgt afgangsvand og ledningsvand, 10 liter pr. prøve samt biofilm fra kant af filter og filtermateriale hvor muligt. Der blev ikke fundet *Legionella* i prøverne fra vandværkerne. Der blev fundet *Legionella* i to af de 37 vandprøver fra ledningsnettet i et niveau på ca. 4 – 40 cfu/liter, der vurderes at være sundhedsmæssigt uproblematisk.

Summary and conclusions

The Danish EPA decided in 2001 to examine Danish drinking water for *Legionella*, as no such investigation had previously been made. This report describes the screening of Danish drinking water for *Legionella*. The purpose of the screening was to investigate whether *Legionella* occurs in drinking water, and, if so, in which concentration – first, to confirm the theory that *Legionella* does not occur in Danish drinking water in concentrations which present any health risk and, secondly, to investigate whether drinking water is a possible source of *Legionella* found in the hot water systems.

The investigation was initiated by a pilot study at three water supplies. The purpose was to decide how to do the sampling, and, at the same time, to evaluate any effects of the modifications including increased sample volumes (10, 50 and 100 litres) and filtration of the water in the field in connection with the sampling itself, introduced to the method of analyses (DS 3029:2001 Enumeration of Legionella – Concentration and colony count on solid medium – Spread plate method). Equipment for sampling has been developed by Eurofins Danmark A/S. Based on the pilot study it was decided that 10 litres of water at the water supply should be filtered at the final screening, whereas it was impossible to sample or filter sufficient amounts of raw water from the water supplies. It was furthermore important to use the correct filter type (0.45 µm mixed esters of cellulose: nitrocellulose and cellulose acetate) in order to filter the water, as it appeared to be impossible for the water to penetrate a 0.45 µm filter of cellulose nitrate.

Legionella was not detected in the samples from the three water supplies. Despite the large sample volume the background flora was not so concentrated that it presented a problem in terms of overgrowth of *Legionella* at the plates. Leaving the samples at room temperature for 48 hours did not have a positive effect on the recovering of stressed *Legionella*, as growth of background flora made it difficult to distinguish any *Legionella* colonies from the background flora. MWY-agar (Modified Wadowsky Yee-agar) was tested in parallel with GVPC agar (Buffered Charcoal Yeast Extract agar with selective supplement) to ascertain whether one medium appeared better for selection and detection of *Legionella* than the other. It was not possible to reach an unambiguous conclusion of the pilot study, and the two agar types were therefore used in parallel in the investigation.

The final screenings of drinking water included 27 water supplies – at which water at the water supply and the distribution network were examined. In addition water from the distribution net of eight other water supplies was analysed. The screening at the water supplies took place at the end of a long hot summer (2002), whereas the screening of the distribution net took place in a cold period (2003). Water at the water supply and tap water were analysed, 10 litres per sample, whereas samples of biofilm from the edge of filter and filter material were analysed whenever possible. No *Legionella* were detected in the samples taken at the water supplies. *Legionella* was detected in two of 37 water samples from the distribution net at a low level of approx. 4 – 40 cfu/litre considered to be harmless for the ingestion of drinking water.

1 Indledning

Dansk drikkevand indvindes stort set udelukkende fra grundvand og er generelt af god bakteriologisk kvalitet. I Danmark findes en udpræget decentral vandforsyningsstruktur, hvor vandet leveres fra omkring 2900 almene vandforsyninger fordelt på ca. 170 kommunale vandforsyninger og ca. 2700 private vandforsyninger. Der er, jævnfør de gældende drikkevandskrav, udarbejdet af Miljøstyrelsen, fastsat grænseværdier for maksimalt indhold af mikroorganismer i vandværkernes afgangsvand samt i vand fra ledningsnet. For afgangsvand gælder, at kimalt 22 °C må være op til 50 cfu pr. ml, mens kimalt 37 °C må være op til 5 cfu pr. ml. For vandet fra ledningsnettet gælder, at kimalt 22 °C må være op til 200 cfu pr. ml, mens kimalt 37 °C må være op til 20 cfu pr. ml.

Det er kun i begrænset omfang undersøgt, hvorvidt dansk drikkevand indeholder *Legionella* og det er ikke undersøgt som en landsdækkende undersøgelse. I takt med den øgede interesse omkring forekomst af *Legionella* i det vandige miljø, der omgiver os, er der et behov for at få afklaret, om *Legionella* findes i drikkevandet.

Legionella er en potentielt sygdomsfremkaldende bakterie. Den kan forårsage Pontiac feber, der er en influenzalignende tilstand samt Legionærsygdom, *Legionella* pneumoni, der er en meget alvorlig lungesygdom. I Danmark registreres der ca. 100 tilfælde af Legionærsygdom årligt med ca. 10-15 dødsfald. Et ukendt antal bliver syge med den mindre alvorlige Pontiac feber.

Legionella findes naturligt i fersk vand og desuden i menneskeskabte nicher, hvor bakterierne opformerer, når vandets opholdstid og temperatur er passende for bakterierne. For varmtvandssystemer må det antages, at *Legionella* fx kan komme ind i systemerne ved installationer og reparationer og deraf følgende forureninger.

Formålet med denne rapport er at undersøge forekomst af *Legionella* i dansk drikkevand, dels for om muligt at bekræfte teorien om, at *Legionella* ikke forekommer i et niveau, der udgør nogen sundhedsrisiko og dels for at se om drikkevand er en mulig kilde til forekomst af *Legionella* i varmtvandssystemerne.

2 Legionella

2.1 Karakterisering af Legionella

Legionella er en Gram-negativ, aerob stavformet bakterie, der forekommer i ferske vandige miljøer i naturen eller i menneskeskabte nicher. **Legionella** har en speciel vækstform, idet den lever som intracellulær parasit hos amøber og dermed er godt beskyttet mod ydre forhold. **Legionella** kan overleve uden for amøber, men vokser i naturen kun inde i amøben.

De optimale temperatur-betingelser for vækst af **Legionella** er ca. 30-40 °C, men vækst ses i intervallet fra ca. 20 til 50 °C og overlevelse i et bredere interval.

Der er beskrevet over 40 arter af **Legionella**, der yderligere kan opdeles i 60 serogrupper. Alle **Legionella** arter må betragtes som værende potentielt sygdomsfremkaldende, men det er kun relativt få af arterne, der konkret har været påvist som årsag til sygdom hos mennesker. Heraf er **L. pneumophila** langt den hyppigste årsag til sygdom. **L. pneumophila** kan opdeles i 3 underarter og indtil videre 15 serogrupper. Serogruppe 1, 3, 5 og 6 er årsag til langt de fleste tilfælde af Legionærsygdom i Danmark og serogruppe 1 tegner sig for ca. 60% af tilfældene.

2.2 Symptomer / Klinisk billede

Legionella kan forårsage to sygdomsforløb, Legionærsygdom og Pontiac feber. Legionærsygdom er en akut forløbende, ofte svær lungebetændelse, der efter en inkubationstid på 2-10 dage, begynder med pludselig høj feber, kulderystelse, hovedpine og senere kommer tør hoste, åndedrætsbesvær og eventuelt påvirkning af organer som lever, nyre og centralnervesystemet. Denne sygdom er indberetningspligtig og der registreres ca. 100 tilfælde af Legionærsygdom årligt i Danmark. Af disse tilfælde varierer dødeligheden fra 5% ved korrekt behandling til over 30% for i forvejen svækkede personer eller personer, der ikke behandles eller behandles for sent.

Pontiac feber er en influenzalignende tilstand med inkubationstid på 1-2 dage og varighed på 2-5 dage. Disse tilfælde diagnosticeres kun sjældent pga. det milde forløb og sygdommen er ikke indberetningspligtig.

Selve smitten med **Legionella** sker typisk ved indånding af **Legionella**-holdige aerosoler, men kan også ske ved aspiration (fejlsynkning). Smitte fra person til person forekommer ikke.

2.3 Vækstbetingelser

Stillestående vand med indhold af næringsstoffer og temperatur i intervallet på 20-50 °C giver mulighed for opformering af **Legionella**. Disse forhold kan opstå i varmtvandssystemer med mange tapsteder, der ikke systematisk anvendes, med overdimensionerede varmtvandsbeholdere, blind-ender,

uhensigtsmæssigt materialevalg mm. Varmtvandsbassiner, spa-bade, køletårne, befugtningsanlæg, fontæner samt isterningmaskiner har endvidere været kilde til Legionærsygdom. Vurdering af disse forskellige kilder er foretaget i Miljøstyrelsens Risikovurdering af *Legionella* (Jeppesen et al., 2004).

3 Forforsøg

Fastlæggelsen af den endelige screening blev foretaget på baggrund af et forforsøg, der havde til formål at undersøge de praktiske forhold ved prøvetagningen samt eventuelle virkninger af modifikationer i forhold til den af Miljøstyrelsen foreskrevne metode (DS 3029, 2001: Miljøundersøgelse – Bestemmelse af legionella – Opkoncentrering og kolonitælling på fast substrat – Overfladeudsæd).

Følgende forhold blev undersøgt:

Prøvetagning, herunder

- Tidsforbrug til prøvetagning af tre forskellige prøvetagningsvolumener
- Antal filtre pr. prøve

Analysemetode, herunder

- Følgefloraens betydning for analysen
- Betydning af anvendt agar (MWY-agar i forhold til GVPC-agar)
- Betydning af modifikationer i metoden (udstrygning af svaberpinde, undersøgelse af filtermateriale)
- Effekt af prøvehenstand ved stuetemperatur for fund af *Legionella* hhv. følgeflora

3.1 Materialer og metoder

3.1.1 Vandværker til forforsøg

Der blev udvalgt tre vandværker: to private vandværker (Vig Lyng vandværk og Kongepartens vandværk) samt ét kommunalt vandværk (Kongsted vandværk), hvor forforsøget kunne udføres.

3.1.2 Prøvetyper

Da der er tale om koldt vand med et forventet lavt indhold af *Legionella* samt for at opnå et så repræsentativt prøvemateriale som muligt, blev prøvevolumen sat op fra den i DS 3029 anbefalede mængde på 1 liter til hhv. 10, 50 og 100 liter.

På hvert vandværk skulle følgende prøver udtages:

- Råvand (10 liter, 50 liter og 100 liter)
- Biofilm fra kant af filter
- Filtermateriale (ca. 1 dl)
- Rentvand (10 liter, 50 liter og 100 liter) (afgangsvand fra vandværket).

3.1.3 Prøvetagning

Prøvetagningen af rå- og rentvand blev foretaget med udstyr, der er udviklet af Eurofins Danmark A/S. Med dette udstyr er det muligt at sterilfiltrere den ønskede vandmængde med positivt tryk ude på prøvetagningsstedet. Udstyret (figur 1) består af en filtreringsenhed forbundet til et vandmåleur monteret samlet i en kasse. Inde i filtreringsenheden lægges et sterilfilter (Millipore Cat. No. HAWG047S1) hvorigennem den ønskede vandmængde filtreres og

herefter transporteres filteret i en bluecapflaske med sterilt ledningsvand til laboratoriet, hvor analysen for *Legionella* udføres.



Figur 1 Prøvetagningsudstyret der er udviklet af Eurofins Danmark A/S. Fil treringsenheden er forbundet til et vandmåleur monteret samlet i en kasse.

Prøvetagning blev foretaget i henhold til intern prøvetagningsbeskrivelse (se bilag A).

Biofilm blev udtaget vha. af svaberpinde og transporteret i en steril stomacherpose til laboratoriet.

Filtermateriale blev udtaget med steril ske, flaske eller stomacherpose og transporteret i en steril stomacherpose til laboratoriet.

Prøverne blev indleveret på laboratoriet samme dag eller dagen efter de blev udtaget. De blev opbevaret på køl ved 6-11 °C under transport og indtil analyse i henhold til ISO 11731.

Det var ikke muligt at udtage filtermateriale og biofilm fra Vig Lyng vandværk.

3.1.4 Prøveperiode

Prøverne til forforsøget blev udtaget i august 2002.

3.1.5 Analysemetode

Prøverne blev analyseret i henhold til DS 3029 med de modifikationer, at prøvolumen var større og filtrering af vandet blev foretaget i forbindelse med selve prøvetagningen. Analysen af prøverne blev påbegyndt på laboratoriet inden for to døgn fra prøvetagningen i henhold til ISO 11731.

I analysen indgår fire trin:

- I. Membranfiltrering (1. opkoncentrering) – er her foretaget i forbindelse med selve prøvetagningen – og vask af filteret
- II. Centrifugering (2. opkoncentrering)
- III. Syrebehandling
- IV. Varmebehandling

Ved analysen af vandprøverne blev trin I (vask af filter) og II udført ved modtagelsen af prøverne. Efter henstand af vandprøverne ved stuetemperatur i 48 timer blev på ny udsæet: Trin I og trin II blev gentaget og trin III og IV blev udført for at undersøge effekt af prøvehenstand ved stuetemperatur for fund af *Legionella* hhv. følgeflora. Forventningen ved henstand er, at eventuelle amøber med indhold af *Legionella* kunne briste og derved frigive bakterierne samt at evt. stressede og ikke dyrkbare *Legionella* kan restituere.

Til analyse af biofilm blev svaberpindene udstrøget direkte på forstøbte plader med GVPC og MWY agar. Efter henstand af svaberpinde i sterilt vand ved stuetemperatur i 48 timer blev de fire trin udført (trin I direkte udsæd af væske uden membranfiltrering).

Til analyse af filtermateriale blev trin I udført med det samme. Efter henstand af filtermateriale ved stuetemperatur i 48 timer blev de fire trin udført (trin I direkte udsæd af væske uden membranfiltrering). Se bilag B med flowskema og beskrivelse af metode.

Pladerne blev inkuberet ved 37 ± 1 °C og aflæst efter 4, 7 og 10 dage.

Som en del af den almindelige kvalitetssikring af analysen er der som positiv kontrol anvendt *Legionella pneumophila* serogruppe 11 til kontrol af at de anvendte substrater er egnede til analysemetoden. I øvrigt testes analysen løbende ved deltagelse i præstationsprøvninger.

Da det anvendte prøvevolumen er større end det i DS 3029 foreskrevne prøvevolumen på 1 liter, forventes det at følgefloraen vil kunne dominere og overskygge for evt. forekomst af *Legionella*. For at vurdere hvorvidt mængden af følgeflora havde betydning for fund af *Legionella*, blev niveauet derfor aflæst ved at tælle alle fremvoksede kolonier. Desuden blev det vurderet hvor høje kolonital, der kunne accepteres for at det stadig var muligt at skelne *Legionella* fra øvrige kolonier.

I DS 3029 anvendes substratet GVPC (Buffered Charcoal Yeast Extract agar med selektivt supplement), som har stor selektivitet for *Legionella* og hæmmende effekt overfor eventuel følgeflora. Da MWY-agar (Modified Wadowsky Yee agar) i nogle sammenhænge nævnes som bedre end GVPC til detektion af *Legionella* blev MWY afprøvet parallelt med GVPC.

3.2 Resultater

3.2.1 Effekt af prøvetagningen

En vigtig faktor i filtreringen af vandet viste sig at være de anvendte filtertyper. Det var stort set ikke muligt at filtrere vandet gennem et 0,45 µm filter af cellulose-nitrat, hvilket først blev forsøgt, mens det derimod var muligt at filtrere vandet gennem 0,45 µm filtre af mixed esters af cellulose filtre

(nitrocellulose og cellulose acetat). Til filtreringen af 10 l afgangsvand blev der anvendt 1-2 stk. filtre pr. prøve, mens der til filtrering af 50 og 100 l blev anvendt op til hhv. 5 og 10 stk. filtre pr. prøve for at filtrere prøven.

Ved udtagning af råvand lukkede membranfiltrene stort set øjeblikkeligt til, fordi råvandet indeholdte for mange partikler til en sterilfiltrering. Løsning med en forfiltrering gennem filter med større porestørrelse viste ikke positiv effekt, idet filtrene stadig lukkede til. Dertil kom at udtagning af råvand ikke var muligt på grund af manglende tryk på råvandet, i de tilfælde, hvor rentvandstanken var fuld. Det blev derfor besluttet at udelukke prøvetagning af råvand i den endelige screening, da de mængder, der ville kunne undersøges, ville være for små til at være relevante.

Tidsforbrug til prøvetagning af 10 l afgangsvand var ca. 20 min., ca. 1,5 time for 50 l og ca. 3 timer for 100 l. Af hensyn til tidsforbruget samt en vurdering af, at 10 liter vand kan betragtes som en tilstrækkelig repræsentativ prøve, blev det besluttet at udtage 10 l afgangsvand til den endelige screening.

Det viste sig, at vandtrykket gennem vandmåleur ikke var nok til at uret kunne registrere vandmængden. Det blev derfor, til den endelige screening, valgt at anvende en 20 liters dunk til måling af den opsamlede mængde vand.

3.2.2 Betydning af analysemetode

I tabel 1 - 3 ses resultaterne fra vandprøverne fra hver af de tre vandværker i forforsøget. Her er det totale antal kolonier på hhv. MWY og GVPC efter inkubering i 10 dage angivet.

Der er ikke påvist **Legionella** i nogen af prøverne. Den positive kontrol, der er med som kvalitetssikring af analysen, har givet typiske resultater.

Tallene for følgefloraen er meget lave, når prøverne analyseres med det samme og følgeflora skønnes derfor ikke at have betydning for analysen. Efter 48 timers henstand ved stuetemperatur viser prøverne høje kintal og det vurderes, at det er problematisk at påvise **Legionella** pga. overvækst fra resten af de observerede kim.

For at undersøge hvorvidt **Legionella** ligger gemt under kolonierne på de overvoksede plader, er der lavet et skrab og udstreget fra fem af de overvoksede plader på Blod agar og BCYE-agar. Enkeltliggende kolonier voksede frem med vækst på begge typer agar og det blev vurderet ved aflæsning af pladerne, at ingen kolonier var typiske **Legionella**. Typiske **Legionella** kolonier ses på BCYE-agar som konvekse, helrandede, glinsende med kornet overflade ("Knust glas"). De er grå, hvide, blå-violette eller limegrønne, hvoraf nogle kan fluorescere. Kolonierne er små (pin-point) efter 2 - 3 dage, men vokser derefter til ca. 3 - 4 mm. Ved mikroskopi ses tynde, slanke stave op til filamentøse.

Der blev således ikke påvist **Legionella** ved den umiddelbare analyse af prøverne og ved henstand af prøverne ved stuetemperatur er der heller ikke påvist **Legionella**. Årsagen til at der ikke påvises **Legionella** efter henstand, kan enten skyldes, at der reelt ikke er **Legionella** i prøverne eller at den opvoksende følgeflora undertrykker/overvokser **Legionella** i selve prøverne.

Tabel 1 Vig Lyng Vandværk, vand afgang og råvand. Tallene angiver det totale antal kolonier på hhv. MWY og GVPC efter inkubering i 10 dage – Ingen af kolonierne er *Legionella*.

Vig Lyng Vandværk	Antal kolonier (MWY, 10 dage) pr. plade								Antal kolonier (GVPC, 10 dage) pr. plade							
	Analyseret med det samme (trin I, II, III, IV)*				Efter 48 timer (trin I, II, III, IV)*				Analyseret med det samme (trin I, II, III, IV)*				Efter 48 timer (trin I, II, III, IV)*			
Prøvetype	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV
10 liter rentvand	20	40	-	-	ov	ov	6	1	2	5	-	-	ov	ov	16	0
50 liter rentvand	6	8	-	-	ov	ov	200	0	0	6	-	-	ov	ov	200	0
100 liter rentvand	30	12	-	-	ov	ov	50	0	5	14	-	-	ov	ov	50	0
6 liter råvand	0	0	-	-	ov	ov	2	16	0	0	-	-	ov	ov	1	5

*Henviser til trin i metoden, jf. bilag B (samt ovenfor)

ov = overvokset

- = ikke udført

Tabel 2 Kongsted Vandværk, vand afgang. Tallene angiver det totale antal kolonier på hhv. MWY og GVPC efter inkubering i 10 dage – Ingen af kolonierne er *Legionella*.

Kongsted Vandværk	Antal kolonier (MWY, 10 dage) pr. plade								Antal kolonier (GVPC, 10 dage) pr. plade							
	Analyseret med det samme (trin I, II, III, IV)*				Efter 48 timer (trin I, II, III, IV)*				Analyseret med det samme (trin I, II, III, IV)*				Efter 48 timer (trin I, II, III, IV)*			
Prøvetype	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV
10 liter rentvand	-	1	-	-	ov	ov	300	2	0	1	-	-	ov	ov	ov	0
50 liter rentvand	0	1	-	-	ov	ov	ov	2	0	0	-	-	ov	ov	ov	2
100 liter rentvand	0	1	-	-	ov	ov	ov	4	4	0	-	-	ov	ov	ov	1

*Henviser til trin i metoden, jf. bilag B (samt ovenfor)

ov = overvokset

- = ikke udført

Tabel 3 Kongepartens Vandværk, vand afgang. Tallene angiver det totale antal kolonier på hhv. MWY og GVPC efter inkubering i 10 dage – Ingen af kolonierne er *Legionella*.

Kongepartens Vandværk	Antal kolonier (MWY, 10 dage) pr. plade								Antal kolonier (GVPC, 10 dage) pr. plade							
	Analyseret med det samme (trin I, II, III, IV)*				Efter 48 timer (trin I, II, III, IV)*				Analyseret med det samme (trin I, II, III, IV)*				Efter 48 timer (trin I, II, III, IV)*			
Prøvetype	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV
10 liter rentvand	50	100	-	-	ov	ov	ov	16	50	50	-	-	ov	ov	20	0
50 liter rentvand	1	20	-	-	ov	ov	ov	0	5	2	-	-	ov	ov	ov	0
100 liter rentvand	4	5	-	-	ov	ov	200	0	2	4	-	-	ov	ov	200	4

*Henviser til trin i metoden, jf. bilag B (samt ovenfor)

ov = overvokset - = ikke udført

I tabel 4 og tabel 5 ses resultaterne fra undersøgelsen af biofilm og filtermateriale fra to vandværker, hvor det var muligt at få adgang til filteret. Der er ikke fundet **Legionella** i de to prøvetyper fra de undersøgte vandværker. I biofilm-prøven fra Kongsted vandværk er der ikke påvist vækst af bakterier på de anvendte dyrkningsplader. I biofilm fra Kongepartens vandværk er der vækst af bakterier efter henstand af prøven ved stuetemperatur i 48 timer, men i overvokset mængde hvorfor det ikke er hensigtsmæssigt at indføre denne henstandstid. Det samme billede tegner sig for resultaterne af undersøgelsen af filtermaterialet. Det besluttes, at der i den endelige screening udtages biofilm og filtermateriale, hvor det er muligt, og at det analyseres med det samme uden henstandstid.

Tabel 4 Kongsted Vandværk, biofilm og filtermateriale. Tallene angiver det totale antal kolonier på hhv. MWY og GVPC efter inkubering i 10 dage – Ingen af kolonierne er *Legionella*.

Kongsted Vandværk	Antal kolonier (MWY, 10 dage) pr. plade								Antal kolonier (GVPC, 10 dage) pr. plade							
	Analyseret med det samme (trin I, II, III, IV)*				Efter 48 timer (trin I, II, III, IV)*				Analyseret med det samme (trin I, II, III, IV)*				Efter 48 timer (trin I, II, III, IV)*			
Prøvetype	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV
Biofilm	0	-	-	-	0	0	0	0	0	-	-	-	0	0	0	0
Filtermateriale	0	-	-	-	37	ov	3	1	0	-	-	-	11	60	23	0
	0	-	-	-	1	9	0	0	0	-	-	-	0	6	0	0

*Henviser til trin i metoden, jf. bilag B (samt ovenfor)

ov = overvokset

- = ikke udført

Tabel 5 Kongepartens Vandværk, biofilm og filtermateriale. Tallene angiver det totale antal kolonier på hhv. MWY og GVPC efter inkubering i 10 dage – Ingen af kolonierne er *Legionella*.

Kongepartens Vandværk	Antal kolonier (MWY, 10 dage) pr. plade								Antal kolonier (GVPC, 10 dage) pr. plade							
	Analyseret med det samme (trin I, II, III, IV)*				Efter 48 timer (trin I, II, III, IV)*				Analyseret med det samme (trin I, II, III, IV)*				Efter 48 timer (trin I, II, III, IV)*			
Prøvetype	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV
Biofilm	0	-	-	-	ov	ov	ov	11	11	-	-	-	ov	ov	ov	2
Filtermateriale	100	-	-	-	100	200	100	30	100	-	-	-	50	ov	3	20

*Henviser til trin i metoden, jf. bilag B (samt ovenfor)

ov = overvokset

- = ikke udført

Det er ikke muligt at konkludere entydigt, hvorvidt MWY-agar er bedre egnet til detektion af **Legionella** end GVPC-agar på baggrund af forsøget. Da der ikke er fundet **Legionella** på nogen af de to medier, kan der ikke foretages en sammenligning af kolonimorfologi, altså om typiske **Legionella** kolonier er nemmere at detektere på det ene medie frem for det andet. Den positive kontrol har opført sig som typiske (konvekse, helrandede, glinsende med kornet overflade ("Knust glas"), grå, hvide, blå-violette eller lime-grønne) **Legionella**-kolonier på begge typer medier. På MWY-medie ses **Legionella** med en mere grønlig nuance, men stadig med den karakteristiske glinsende og kornede overflade ("Knust glas"). Endvidere er der ikke nogen entydig

tendens i antallet af kimtal fra følgefloraen på de to medier, der kan beskrive en fordel ved at bruge det ene medie frem for det andet. Det er således ikke muligt at vurdere, hvorvidt følgefloraen hæmmes mere på det ene medie frem for det andet.

Svaberpindene blev anvendt til at udtage biofilm fra filterunderside. De var fugtige ved modtagelsen i laboratoriet og ved analysestart og det vurderes, at **Legionella** ville være i stand til overleve på denne måde. Samme metode anvendes generelt til hygiejneprøver og rengøringskontrol, blot hvor de anvendte svaberpinde holdes fugtige i transportmediet, fx Ringer's væske.

3.3 Konklusion

Det vurderes, at tidsforbruget til prøvetagning ikke stod i forhold til udbyttet ved de store prøvevolumener (50 og 100 liter). Der blev ikke observeret markant flere mikroorganismer ved de store prøvevolumener i forhold til et prøvevolumen på 10 liter. Som følge deraf blev det vurderet, at der heller ikke er en større sandsynlighed for fund af **Legionella** ved de store prøvevolumener. Hertil kommer, at mikroorganismer ved filtrering af meget store mængder bliver udsat for et øget fysisk pres. Det blev derfor valgt at anvende prøvetagning af 10 liter afgangsvand. Desuden var det vigtigt at anvende de korrekte filtre, nemlig 0,45 µm filtre af mixed esters af cellulose (nitrocellulose og cellulose acetat). Af disse blev der anvendt 1-2 stk. pr prøve alt efter partikelindhold i vandet, således at filteret ikke stoppede til.

Der blev ikke fundet **Legionella** i prøverne fra de tre vandværker. Det blev vurderet, at følgefloraen ikke var så kraftig, at den gav problemer i forbindelse med aflæsning af pladerne for **Legionella**. Det ville stadig være muligt at skelne typiske **Legionella** kolonier fra andre typer bakterier. Det gav ikke nogen positiv effekt at lade prøven henstå ved stuetemperatur i 48 timer, idet mere følgeflora evt. kunne dække for **Legionella**-kolonier. MWY-agar køres parallelt med GVPC-agar til den endelige screening af rentvand fra vandværkerne, da det ikke var muligt at konkludere éntydigt på baggrund af forforsøget.

Endvidere blev det valgt, at de afprøvede modifikationer i forhold til DS 3029:2001 i form af udtagning af biofilm fra kant af filter samt filtermateriale, kunne anvendes til den endelige screening, da det er en kendt metode fra rengørings- og hygiejnekontrol.

Samlet konkluderes, at:

- filtertype til membranfiltrering skal være 0,45 µm mixed esters af cellulose
- prøvetagning af råvand i relevant volumen ikke er mulig
- der til den endelige screening udtages 10 l afgangsvand (tidsforbrug ca. 20 min).
- der anvendes 1-2 stk. filtre pr. prøve
- der ikke er påvist **Legionella** i prøverne fra forforsøget
- følgeflora dominerer efter henstand af prøver i 48 timer før analyse, hvorfor denne fremgangsmåde ikke er anvendelig
- det ikke er muligt at konkludere éntydigt, hvorvidt MWY-agar er mere selektiv i forhold til GVPC på baggrund af forforsøget.
- **Legionella** vurderes at være i stand til at overleve ved brug af svaberpinde til undersøgelse af biofilm fra filterunderside.

4 Udvalgelse af vandværker

Der blev udvalgt 27 vandværker med tilhørende ledningsnet til den endelige screening for *Legionella*. Vandværkerne blev primært udvalgt på baggrund af følgende tre kriterier:

- Geografisk fordeling i hele Danmark (Bornholm og småøer undtaget af praktiske årsager)
- Repræsenterende varierende geologiske betingelser, bl.a. hvad angår indhold af fx jern og organisk materiale.
- Vandværk med mere end 100 brugere

Efterfølgende blev mulighed for at supplere med yderligere vandprøver fra ledningsnettet hørende til otte andre kommunale vandværker.



Figur 2 Danmarks kort med angivelse af de udvalgte vandværkers placering. Stjerne (blå) spot markerer de private vandværker og rund (orange) spot markerer de kommunale vandværker.

På figur 2 kan placeringen af de i alt 35 vandværker ses. De fleste kommunale vandværker blev udvalgt af Dansk Vand og Spildevand, der bl.a. har kendskab til de geologiske betingelser og dermed til forskellene vandværkerne imellem. De private vandværker blev efter aftale med Foreningen af vandværker i Danmark udvalgt fra deres hjemmeside, www.fvd.dk, på baggrund af geografisk placering samt om vandværket har mere end 100 brugere.

En samlet oversigt over de deltagende vandværker med angivelse af prøvetyper (se også kap. 5) fremgår af bilag C.

Som dokumentation for de varierende geologiske betingelser og dermed variation i vandkvaliteten er der ved en stikprøve fra 18 af de 27 vandværker indhentet oplysninger om de seneste vandresultater. I tabel 6 ses intervallet på ni udvalgte parametre fra disse vandværker, hvilket viser, at det undersøgte vand repræsenterer en stor variation. Parametrene er udvalgt med baggrund i hvilke forhold, der kan være betydende for mikroorganismers generelle vækst. **Legionella** har fx brug for et vist niveau af jern for at kunne vokse, og det kunne tænkes at de områder, hvor vandet har et større jernindhold, ligeledes har større sandsynlighed for tilstedeværelse eller vækst af **Legionella**. Jo mere organisk materiale vandet indeholder, jo bedre vækstbetingelser vil man forvente at mikroorganismer har. I bilag D er de enkelte værdier angivet for hvert vandværk.

Tabel 6 Interval på de udvalgte parametre fra en stikprøve fra 18 af de 27 vandværker.

Parameter	Interval
Fe, total mg/l	<0,005-2,7
Ca, mg/l	46-110
Inddampningsrest, Tørstof mg/l	212-583
NVOC, mg C/l	0,53-4,1
pH	7,2-8,5
Ledningsevne, mS/m	35-100
Coliforme bakterier, cfu/100ml	<1
Kimtal 22°C, cfu/ml	<1-39
Kimtal 37°C, cfu/ml	<1-4

Da vandet stammer fra mange forskellige vandværker, repræsenterer prøverne samtidig en variation i vandbehandling. Vandværkerne blev forespurgt om forhold som beluftning af vand, filtertyper, UV-behandling mv. Svarene viste, at de helt dominerende behandlingstyper er beluftning af vandet, brug af åbne filtre og filtermateriale bestående af sand/grus/sten. UV-behandling, kalktilsætning, Nikkel-rensning og trykfilteranlæg forekommer kun helt sporadisk, mens ca. hvert fjerde vandværk har afblæsningsanlæg til methan.

5 Fastlæggelse af prøvetyper

Der blev til den endelige screening på de 27 af vandværkerne udtaget flg. prøvetyper:

- 10 liter afgangsvand
- biofilm fra kant af filter
- filtermateriale (ca. 1 dl)

Da der er tale om koldt vand med et forventet lavt indhold af **Legionella** samt for at opnå et så repræsentativt prøvemateriale som muligt, blev prøvevolumen sat op fra den i DS 3029 anbefalede mængde på 1 liter til 10 liter. Denne mængde blev bestemt under forforsøget.

Biofilm blev udtaget på de vandværker, hvor det var praktisk muligt, hvilket vil sige 15 ud af de 27 vandværker. På overflader, der er i berøring med vand, kan biofilm dannes. Det er belægninger, der består af et komplekst mikrobielt samfund med forskellige mikroorganismer som aerobe og anaerobe bakterier, amøber, protozoer og svampe indlejret i både organiske og uorganiske stoffer. Der er mulighed for, at **Legionella** vil kunne overleve heri gennem længere tid.

Ved udtagning af biofilm på vandværkerne blev lugt og udseende noteret. Lugten blev vurderet at variere fra neutral til metalagtig og kloakagtig. Udseende blev beskrevet med farver varierende fra okker over gul til sort og brunt.

Filtermateriale blev udtaget på de vandværker, der havde åben filtertype, hvilket var 18 ud af de 27 vandværker. På overfladen af filtermateriale vil der dannes biofilm og dermed være mulighed for, at **Legionella** kan overleve gennem længere tid.

På ledningsnettet hørende til de i alt 35 vandværker blev der udtaget flg. prøvetype:

- 10 l ledningsvand fra et egnet tapsted placeret ude på ledningsnettet. For to af vandværkerne blev der udtaget prøver fra to forskellige steder (37 prøver i alt).

De fleste tapsteder blev udpeget af personale på vandværkerne som de steder, der normalt anvendes af vandværkerne ved rutinemæssig kontrol af ledningsnettet. Tapstederne er udehaner, prøvehaner og blandingsbatterier hos forskellige forbrugere fx børnehaver og firmaer.

Ti af tapstederne blev udpeget af prøvetager selv som typiske og er bl.a. hane i fyrrum, som betragtes som "worst case" i forbindelse med **Legionella**.

I bilag C ses hvilke prøvetyper, der er udtaget på de enkelte vandværker.

6 Metoder

6.1 Prøvetagning

Prøvetagningen fra afgang vandværk og ledningsnettet blev foretaget i henhold til intern prøvetagningsbeskrivelse (se bilag A). Det vil sige efter afsprøjtning og gennemskylning af prøveudstyr, blev 10 liter vand filtreret på prøvetagningsstedet på 10-20 min. Der blev anvendt 1-2 stk 0,45 µm filtre af mixed esters af cellulose (nitrocellulose og cellulose acetat). Prøverne er udtaget som 5 minutters prøver i henhold til DS 2250, hvori det foreskrives, at drikkevand udtages efter, at vandet har løbet med jævn stråle i 5 minutter.

Biofilm blev udtaget vha. af 1-2 stk. sterile svaberpinde og transporteret i en steril stomacherpose til laboratoriet. Et område på ca. 10 cm² blev svabret. Filtermateriale blev udtaget med steril ske, flaske eller stomacherpose og transporteret til laboratoriet. Der blev udtaget ca. 1 dl filtermateriale fra toppen.

Prøverne blev indleveret på laboratoriet samme dag eller dagen efter de blev udtaget. De blev opbevaret på køl ved 6-11 °C under transport og indtil analyse i henhold til ISO 11731.

6.2 Prøveperiode

Prøverne til den endelige screening på vandværkerne blev udtaget efter en lang varm sommerperiode (september til oktober 2002).

Prøverne fra ledningsnettet blev udtaget i en kold vinterperiode (januar 2003).

6.3 Analysemetode

Prøverne blev analyseret i henhold til DS 3029 med de modifikationer, at prøvevolumen var større (10 liter), og at filtrering af vandet blev foretaget i forbindelse med selve prøvetagningen. Analysen af prøverne blev påbegyndt på laboratoriet inden for 2 døgn fra prøvetagningen i henhold til ISO 11731.

Efter nedenstående trin til hver prøvetype blev pladerne inkuberet ved 37 ± 1 °C og aflæst efter 4, 7 og 10 dage. Typiske *Legionella* kolonier ses som konvekse, helrandede, glinsende med kornet overflade ("Knust glas"). De er grå, hvide, blå-violette eller lime-grønne, hvoraf nogle kan fluorescere. Kolonierne er små (pin-point) efter 2 – 3 dage, men vokser derefter til ca. 3 – 4 mm. Ved mikroskopi ses tynde, slanke stave op til filamentøse. Suspekter kolonier blev verificeret ved vækst på BCYE og ingen vækst på BA ved 37 ± 1 °C, min. 2 dage.

Detaljeret flowskema og beskrivelse af metode findes i bilag E og bilag F. I bilag G ses beregningerne til opkoncentreringsgrad, beregningsfaktor og detektionsgrænser.

6.3.1 Vandprøver

Fire trin indgik i analysen af vandprøver

- I. Membranfiltrering (1. opkoncentrering) – er her foretaget i forbindelse med selve prøvetagningen – og vask af filtre
- II. Centrifugering (2. opkoncentrering)
- III. Syrebehandling
- IV. Varmebehandling

For ledningsvand indgik yderligere ét trin som en afprøvning:

- V. Syrevask af filter og efterfølgende direkte inkubering af filter på agarplade (for at undersøge, om der sidder *Legionella* tilbage på filtret efter vask).

6.3.2 Biofilm og filtermateriale

Svabere med biofilm blev udstrøget direkte på forstøbte plader med GVPC og MWY agar.

Filtermateriale blev analyseret ved:

0. Direkte udsæd af væske
- I. Direkte udsæd af væske efter rystebord/vask
- II. Centrifugering (1. opkoncentrering)
- III. Syrebehandling
- IV. Varmebehandling

7 Resultater

7.1 Forekomst af *Legionella* i vandværker med tilhørende ledningsnet

Direkte syrebehandling af filtre gav ingen fund af ***Legionella***. Det tyder således ikke på, at der er ***Legionella***, der er fanget på filtret og ikke kan vaskes af.

I tabel 7 ses resultaterne fra undersøgelsen af vandværkerne og tilhørende ledningsnet.

Der er ikke fundet ***Legionella*** i prøverne fra afgang vandværk. Temperaturen på vand afgang vandværk er under 12°C (oplyst fra vandværkerne).

Prøverne fra ledningsnet er udtaget fra normale tapsteder som er udehaner, prøvehaner, haner i fyrrum og blandingsbatterier hos forskellige forbrugere fx børnehaver og firmaer.

Der er fundet ***Legionella*** i 2 af de 37 prøver fra ledningsnettet.

Den ene prøve er udtaget fra en hane, der befinder sig i et varmt fyrrum. Denne prøve kan betragtes som worst case pga. den varme temperatur i rummet, der giver gode vækstbetingelser for ***Legionella***. Der er påvist ***Legionella*** spp. (non-pneumophila og ikke mulig at type med kommercielle kits) i niveauet ca. 40 cfu pr. liter. Temperaturen på vandet var 8°C.

Den anden positive prøve er udtaget i et vaskerum i kælder fra et blandingsbatteri, og der er påvist ***Legionella pneumophila*** serogruppe 2-14 i niveauet ca. 4 cfu pr. liter. Temperaturen på vandet var 9°C.

Tabel 7 Undersøgelse af vandværkerne og tilhørende ledningsnet for *Legionella*

Prøvetype	Antal prøver analyseret	Antal prøver hvor <i>Legionella</i> er påvist
Afgangsvand	27	Ingen
Biofilm	15	Ingen
Filtermateriale	15	Ingen
Ledningsnet	37	2, heraf: én med ca. 40 cfu/liter og én med ca. 4 cfu/liter.

Temperaturen på vand fra ledningsnet varierede fra 4 – 16 °C.

Der er udtaget opfølgende prøver med prøvevolumenerne 1, 10 og 25 liter fra det ene af de to positive prøvesteder (varmt fyrrum) med henblik på at vurdere forekomsten nærmere. Det lykkedes ikke at udtage en ny prøve fra det andet positive prøvetagningssted (blandingsbatteriet).

Resultaterne fra det varme fyrrum viste fortsat fund af ***Legionella*** spp. Denne gang i niveauet ca. 100 cfu/liter (variation fra ca. 4 til ca. 100 cfu) ved udtagning af 10 liter vand. Umiddelbart efter prøven på 10 liter blev udtaget en prøve på 25 liter med henblik på at øge detektionsgrænsen (<2 cfu/liter). I 25 liters prøven blev kun påvist ca. 8 cfu pr. liter. Det lavere fund i 25 liters

prøven kan umiddelbart tilskrives det forhold, at prøvetagningshanen og det nærmeste ledningsstykke var blevet gennemskyllet ved udtagning af 10 liters prøven, der indeholder mest biofilm. Der er anvendt forholdsmæssigt lige mange filtre til de to prøvetagninger, så fysisk stressning pga. større prøvevolumen er næppe sandsynligt. Der blev ikke påvist *Legionella* ved udtagning af 1 liter vand.

Følgefloraen er generelt lav, idet den ligger fra ingen kolonier til 5 atypiske kolonier, der vokser frem på GVPC-agar.

8 Diskussion

Undersøgelser i Danmark viser, at varmt vand (<50 °C) stort set altid indeholder *Legionella*. I undersøgelser af koldt vand i form af brøndvand fra USA samt regn- og gråvand fra Danmark har det været muligt at påvise *Legionella* spp., og dette var også tilfældet i koldt ledningsvand på et rehabiliteringscenter. Men da temperaturen periodisk var op til 40 °C, må de positive fund i ovennævnte undersøgelser alle betragtes som værende fra belastet vand i forhold til dansk drikkevand. I en undersøgelse af eftervækstpotentialet i vand fra 10 vandværker i Københavnsområdet og Nordsjælland kunne der ikke påvises *Legionella* i prøver á 1 liter (Jørgensen et al., 2002).

I modsætning til tidligere geografisk begrænsede undersøgelser af dansk vand, dækker denne undersøgelse geografisk bredt. Konklusionerne bygger derfor på vand repræsenterende varierende geologiske betingelser og dermed stor variation i vandkvaliteten.

Denne undersøgelse af dansk drikkevand, viste ingen fund (< 4 cfu/liter) af *Legionella* i afgangsvand fra vandværker. Prøverne fra vandværkerne blev udtaget i slutningen af en lang varm periode, der for *Legionella* må betragtes som "worst case". Det antages derfor, at det vil være usandsynligt, at *Legionella* skulle være at finde på vandværkerne i en kold periode. Der er ikke fundet *Legionella* i biofilm fra kant af filter eller filtermateriale, der ellers kunne tænkes at være en potentiel opformeringsniche pga. tilstedeværende amøber og organisk materiale. Det tyder derfor på, at *Legionella* ikke er i råvandet og ikke er at finde på vandværkerne og i afgangsvand fra vandværk.

I Danmark indvindes 99% af råvandet fra grundvand og er almindeligvis af god kvalitet. I lande, hvor der indvindes overfladevand til drikkevand, vil der kunne findes *Legionella* i drikkevandet, da amøber og *Legionella* har lettere adgang til overfladevand. Referencer med fund af *Legionella* i råvand til drikkevand skal som nævnt ovenfor ses i sammenhæng med indvinding af overfladevand og en høj temperaturlastning i forhold til i Danmark. Sammenholdt med at temperaturlastningen af råvandet er lav i Danmark, stemmer det overens med de negative fund af *Legionella* i drikkevandet i denne undersøgelse.

Ved undersøgelse af ledningsnettet blev der fundet *Legionella* i to ud af 37 vandprøver. Den ene var *Legionella* spp. (non-pneumophila) og den anden var *Legionella pneumophila* serogruppe 2-14. Den førstnævnte vandprøve er udtaget fra en hane, der befinder sig i et varmt fyrrum. Det vil sige, at de varme betingelser gør det muligt for *Legionella* at overleve og eventuelt opformere sig i en prøvetagningshane og i den del af ledningsnettet, der befinder sig i fyrrummet. Der er her tale om en uhensigtsmæssig foranstaltning i forbindelse med indretningen af ledningsnet til drikkevand. Den anden vandprøve er udtaget fra et blandingsbatteri i et vaskerum i kælder, og blandingsbatteriet må betragtes som en potentiel årsag til, at *Legionella* kan påvises i vandet på grund af de passende temperaturforhold. Det vil sige, at uhensigtsmæssige installationer eller indretninger med høje

temperaturbelastninger kan medføre fund af **Legionella** på trods af, at der ikke blev påvist **Legionella** i afgangsvand fra vandværkerne.

Af de to positive prøvetagningssteder er det ene udpeget af vandværket og det andet valgt af prøvetager som normal prøvetagningsstede. Som sådan må stederne betragtes som normale, men uhensigtsmæssige drikkevandshaner/-installationer .

Det vurderes således, at **Legionella** næppe findes i grundvandet, hvor der er lav temperatur, iltfri forhold og manglende tilstedeværelse af amøber. Når **Legionella** findes i dansk drikkevand antages det at kunne henføres til indføring i forbindelse med boringer, rørføringer og installationer – herunder åbne filtre – på vandværkerne, men sandsynligvis også via installationer og reparationer på ledningsnettet, forureninger af drikkevandet pga. utætheder mm. samt indføring af **Legionella** ”baglæns” i systemet, dvs. via haner og perlatorer/grovfiltre på hanerne. Det bemærkes i den sammenhæng, at der i forbindelse med ny boringer samt installationer på vandværker foretages grundig gennemskylning før ibrugtagning.

Ledningsnettet vurderes derfor at have en større risiko for forekomst af **Legionella** end vandværkerne på grund af større sandsynlighed for temperaturbelastning samt længere rørføringer og flere steder med risiko for forureninger.

De to fund af **Legionella** fra ledningsnettet er påvist i lav koncentration (ca. 4 – 100 cfu pr. liter). Dette stemmer godt overens med de betragtninger, der er foretaget i risikovurderingen, der er udarbejdet af Miljøstyrelsen, nemlig at med et temperaturkrav til dansk drikkevand på max. 12 °C vil **Legionella** ikke kunne vokse, men dog overleve.

Prøverne fra ledningsnettet blev udtaget i en kold vinterperiode. Som nævnt er temperaturbelastningen af vandet i ledningsnettet i Danmark relativ lav. Dvs. det er en kort periode om sommeren, hvor der kan måles temperaturer i nærheden af 20 °C og højere. Derfor anses det ikke som en potentiel risiko, at der vil kunne påvises **Legionella** i ledningsnettet i en varm periode i et niveau, der vil udgøre et problem.

Netop temperaturfaktoren er meget væsentlig, idet der udover vækstintervallet for **Legionella** er set, at temperaturen har haft betydning for forholdet mellem amøber og **Legionella**, således at amøberne fjerner (fagocyterer) **Legionella** ved temperaturer som i koldt drikkevand.

Dette forhold understøttes også af fund i en undersøgelse af kulfiltre fra svømmebade (Jeppesen et al., 2000). Kulfiltrene inaktiverer klor og opsamler organisk materiale og er dermed deciderede opformeringssteder for mikroorganismer. I undersøgelsen blev der påvist **Legionella** i 80% af kulfiltrene fra varmtvandsbassiner (> 32 °C), men ikke i nogle af kulfiltrene fra koldt vandsbassiner (< 28 °C).

I Danmark er der aldrig påvist egentlige udbrud af legionærsygdom, dvs. hvor der er mere end ét tilfælde smittet fra samme kilde. Da drikkevand indgår i hverdagens daglige rutiner, måtte man forvente langt flere egentlige udbrud end de 100 tilfælde, der årligt registreres i Danmark, hvis drikkevandet indeholdt **Legionella** i sundhedsskadelige mængder.

Det vurderes således, at **Legionella** ikke udgør et problem i drikkevand, der i øvrigt lever op til gældende drikkevandskrav.

I denne undersøgelse af dansk drikkevand er prøvetagningsvolumen øget fra 1 til 10 liter for at øge følsomheden/sænke detektionsgrænsen, da eventuel forekomst af **Legionella** netop forventedes at være lav. Til prøvetagningen blev udviklet et særligt prøvetagningsudstyr, der muliggør filtrering af vandet på prøvetagningsstedet og dermed gør transport af prøver og håndtering af prøver i laboratoriet væsentligt lettere. Lignende udstyr kan fås kommercielt.

Der er en risiko for, at de **Legionella**, der evt. findes i drikkevand, kan være i et stadie, der gør, at de ikke kan dyrkes (VBNC - Viable But Non-Culturable-form), hvor den sundhedsmæssige betydning heraf ikke er tilstrækkeligt belyst. Men en samlet vurdering baseret på de forhold, der er nævnt i diskussionen, er at de enkelte lave fund og de mange negative fund betragtes som valide resultater, der er i god overensstemmelse med den viden, der findes om **Legionella**'s vækstbetingelser.

Denne undersøgelse viser således, at der ikke er belæg for rutinemæssig undersøgelse af drikkevand for **Legionella**, og analysen bør heller ikke indgå som en fast parameter ved analyse af drikkevandsprøver. Hvis man af andre årsager ønsker at undersøge drikkevand, bør man dog undersøge større volumener end det i DS 3029 angivne på 1 liter og som her tage op til 10 liter i arbejde.

9 Konklusion

I denne undersøgelse er der undersøgt vand fra i alt 35 vandværker. Fra de 27 af vandværkerne, der repræsenterer et bredt spektrum af varierende geologiske betingelser og dermed variation i vandkvaliteten, er der analyseret såvel afgangsvand som vand fra ledningsnet og om muligt filtermateriale. Fra de otte øvrige vandværker er der analyseret vand fra ledningsnettet. I alt blev analyseret 37 ledningsnetprøver, da der på to ledningsnet blev udtaget prøver fra to forskellige steder.

Der er ikke påvist *Legionella* i afgangsvandet fra de undersøgte vandværker eller fra mulige opformeringsnicher som biofilmen fra kant af filter eller i filtermaterialet.

Ved et forforsøg blev det klarlagt, at det ikke var muligt at udtage og filtrere råvand i tilstrækkeligt store volumener. Membranfiltrene stoppede øjeblikkeligt til grundet højt partikelindhold, og desuden var udtagning af råvand reelt ikke mulig pga. manglende tryk på råvandet, når rentvandstanken var fuld. Der er derfor ikke undersøgt råvand, men afgangsvand og vand fra ledningsnettet. Samtidig er afgangsvand at betragte som opsamlende for kvaliteten af råvand med efterfølgende behandlinger på vandværket.

I vand fra ledningsnettet er der kun påvist *Legionella* i 2 ud af 37 prøver. I de to positive prøver er der påvist hhv. *Legionella* spp. og *Legionella pneumophila* serogruppe 2-14 i niveauer på ca. 4 - 100 cfu pr. liter. Begge prøver er udtaget fra steder, hvor uhensigtsmæssige forhold bevirker, at ledningsnettet bliver belastet i form af for høje temperaturer (varmt fyrrum hhv. blandingsbatteri) og dermed giver mulighed for overlevelse af *Legionella*. Prøvetagningsstederne kan betragtes som normale, men uhensigtsmæssige prøvetagningshaner for drikkevand.

Legionella findes næppe i grundvandet, hvor der er lav temperatur, lav iltspænding og manglende tilstedeværelse af amøber. Tilgangen af *Legionella* til drikkevandsnettet er sandsynligvis via installationer, reparationer, vandhaner og lignende. I den forbindelse vil ledningsnettet være mere udsat end vandværkerne, dels fordi der foretages gennemgribende gennemskylninger efter installationer og reparationer, dels er der færre fittings og generelt lavere temperaturer end på ledningsnettet.

Samlet konkluderes på baggrund af denne undersøgelse, at *Legionella* ikke udgør et problem i dansk drikkevand, der overholder temperaturgrænserne for drikkevand, dvs. højst er 12 °C.

10 Baggrundslitteratur

- Albrechtsen HJ (1998)** Boligernes vandforbrug. Mikrobiologiske undersøgelser af regn- og gråvandsanlæg. Miljø- og Energiministeriet. Miljøstyrelsen. Bolig- og Byministeriet.
- Bangsborg JM & Uldum S (2001)** *Legionella* infektioner: Diagnostiske og profylaktiske udfordringer. Ugeskrift for Læger, 4, 22. januar.
- Brydov P, Uldum S, Pringler N & Jepsen OB (2001)** Forekomst af *Legionella* i varmvandssystem. Identifikation og risikovurdering. Miljøprojekt nr. 653. Miljøstyrelsen, Miljø- og Energiministeriet, Strandgade 29, 1401 Kbh. K.
- DS 3029 (2001)** Miljøundersøgelse - Bestemmelse af legionella - Opkoncentrering og kolonitælling på fast substrat - Overfladeudsæd.
- Hoebe CJ, Cluitmans JJ, Wagenvoort JH, van Leeuwen WJ & Bilkert-Mooiman MA (1999)** Cold tap water as a source of fatal nosocomial pneumonia due to *Legionella pneumophila* in a rehabilitation center. Ned Tijdschr Geneeskd, 143 (20) pp. 1041-1045.
- ISO 11731 (1998)** Water quality – Detection and enumeration of *Legionella*. First edition.
- Jeppesen C, Bagge L & Jeppesen V (2000)** *Legionella pneumophila* i bassinvand. Ugeskrift for Læger, 162/25, pp. 3592 – 3594, 19. juni.
- Jeppesen, V. & Jeppesen, C. (2000)** *Legionella pneumophila* – amøbeparasit og humanpatogen. Alimenta, 5, pp. 8-13.
- Jeppesen VF, Jeppesen C, Pringler N, Jensen ET & Uldum S (2004)** Forekomst af *Legionella* – Risikovurdering. Miljøprojektet 897, Miljøstyrelsen. www.mst.dk.
- Jørgensen C, Albrechtsen H-J, Arvin E & Corfitzen C B (2002)** Undersøgelse af bakterieantal og eftervækstpotentiale i vandværksvand. Miljøprojekt nr. 719. Miljøstyrelsen, Miljø- og Energiministeriet, Strandgade 29, 1401 Kbh. K.
- Riffard S, Douglass S, Brooks T, Springthorpe S, Fillion LG & Sattar SA (2001)** Occurrence of *Legionella* in groundwater: an ecological study. Water Science and Technology, 43 (12) pp. 99 – 102.
- Statens Serum Institut (2000)** *Legionella* i varmt brugsvand. Overvågning, udredning og forebyggelse af legionærsygdom. 1. udgave. Den Centrale Afdeling for Sygehushygiejne, Statens Serum Institut, Artillerivej 5, 2300 Kbh. S.

Prøvetagningsbeskrivelse

Arbejdet med udstyret til filtreringen foregår under så aseptiske betingelser som muligt. Filtreringsenheden samt slangen, der monteres på hanen, desinficeres med sprit. Udstyret placeres i vatter og filterholderen skrues af. Efter afskylning med sprit samles det hele igen, og vandet løber igennem. Herefter åbnes filterholderen atter og filteret indsættes med tællefelterne opad. Den øverste del af filtreringsenheden skrues på igen, og afløbsslangen sættes ned i en dunk, hvorefter der åbnes for hanen. Den ønskede mængde filtreret vand opsamles i dunken og filteret fra filtreringsenheden placeres i en bluecap flaske med sterilt ledningsvand (10 ml til forforsøg og 20 ml til den endelige screening). Efter filtrering skylles filterholderen i sprit og slangen afmonteres for at blive rensset i sprit inden næste prøveudtagningssted.



Figur 1
Filtreringsenheden åbnes ved at skrue øverste del af.



Figur 2
Fil ter kan nu placeres i fil treringsenheden.



Figur 3
Den øverste del af fil treringsenheden skrues på igen.



Figur 4
Efter fil trering skrues øverste del af fil treringsenheden af og fil ter placeres i bluecap flaske med steril t ledningsvand til opbevaring under transport til laboratoriet.

Forforsøg, flowskema og beskrivelse af mod. DS 3029

Med det samme	Efter 48 timer	
Rystebord, 1 t, Ila	-	I
↓	-	
Udså 0,1 ml på GVPC og MWY	Udså 0,1 ml på GVPC og MWY	
↓	↓	
2,0 ml af Ila i eppendorfrør	3 x 2,0 ml af Ila i eppendorfrør	II
↓	↓	
Centrifugeres	Centrifugeres	
↓	↓	
Fjern 1,7 ml	Fjern 1,7 ml fra rør 1 Fjern 1,7 ml fra rør 2 Fjern 1,8 ml fra rør 3	
↓	↓	
Whirlmix og udså 0,1 ml på GVPC og MWY	Whirlmix og udså 0,1 ml på GVPC og MWY fra rør 1	
	↓	
	Rør 2 sættes i vandbad 50 °C, 30 min →	Udså 0,1 ml på GVPC og MWY IV
	↓	
	Rør 3 tilsættes 1,8 ml syrebuffer	
	↓	
	Henstår 5 min	
	↓	
	Whirlmix og udså 0,1 ml på GVPC og MWY	III

Alle plader inkuberes og aflæses som flg.:

INKUBERING

37,0 ± 1,0°C i lukkede plastposer.

AFLÆSNING

Aflæs efter ca. 4 og ca. 7 dage. Slut aflæs efter 10 dage.

Typiske kolonier er konvekse, helrandede, glinsende med kornet overflade ("Knust glas") – se evt. under stereomikroskop. Grå, hvide, blå-violette eller lime-grønne. Nogle kan fluorescere. Kolonierne er små (pin-point) efter 2 – 3 dage, men vokser derefter til ca. 3 – 4 mm. Ved mikroskopi ses tynde, slanke stave op til filamentøse.

VERIFIKATION

Indgik ikke i forforsøg, da der ikke var fund af suspekter *Legionella*.

Fire trin indgår i analysen af vandprøver

- **I. Membranfiltrering (1. opkoncentrering):** 10 l, 50 l og 100 l filtreres på vandværket, og filter overføres til bluecapflaske med hhv. 10 ml, 10 ml og 50 ml sterilt ledningsvand. Flasken rystes på rystebord ved 200 rpm i 60 ± 5 minutter. Herved koncentrerer prøven hhv. 1.000 X, 5.000 X og 10.000 X. 0,1 ml udsås på overfladen af GVPC og MWY agar.
- **II. Centrifugering (2. opkoncentrering):** 2 ml af den opkoncentrerede prøve (I) afpipetteres i et sterilt Eppendorfrør, der centrifugeres ved 8000 g i $5 \pm 0,5$ minutter. Efter centrifugering afpipetteres (fjernes) 1,7 ml supernatant. Herved opkoncentrerer prøven yderligere 6,7 X. Den resterende prøvemængde (0,3 ml) rystes på whirlmixer. 0,1 ml udsås på overfladen af GVPC og MWY agar.
- **III. Syrebehandling:** 2 ml af den opkoncentrerede prøve (I) afpipetteres i et sterilt Eppendorfrør, der centrifugeres ved 8000 g i $5 \pm 0,5$ minutter. Efter centrifugering afpipetteres (fjernes) 1,8 ml supernatant. Herved opkoncentrerer prøven yderligere 10 X. Den resterende prøvemængde (0,2 ml) rystes på whirlmixer. Til de 0,2 ml tilsættes 1,8 ml syrebuffer pH 2,2. Herved fortyndes prøven 10 X. Henstand ved stuetemperatur i $5 \pm 0,5$ minutter. 0,1 ml udsås på overfladen af GVPC og MWY agar.
- **IV. Varmebehandling:** 2 ml af den opkoncentrerede prøve (I) afpipetteres i et sterilt Eppendorfrør, der centrifugeres ved 8000 g i $5 \pm 0,5$ minutter. Efter centrifugering afpipetteres (fjernes) 1,7 ml supernatant. Herved opkoncentrerer prøven yderligere 6,7 X. Den resterende prøvemængde (0,3 ml) rystes på whirlmixer. Røret sættes i vandbad ved 50 ± 1 °C i 30 ± 2 minutter. 0,1 ml udsås på overfladen af GVPC og MWY agar.

Prøver af biofilm og filtermateriale

- Svabere udstryges direkte på plader med GVPC og MWY agar. Svabere lægges i bluecapflaske med ledningsvand og efter henstand ved stuetemperatur i 48 timer udføres de fire ovenstående trin.
- Fra filtermateriale udføres direkte udsæd efter rystebord (trin I): 0,1 ml udsås på overfladen af GVPC og MWY agar. Hvis konsistensen tillader det, foretages direkte udsæd fra den ufortyndede prøve ellers fra fortyndet prøve.
- **II. Centrifugering, III. Syrebehandling og IV. Varmebehandling:** Foretages som til analyse af vandprøven med den modifikation, at der afpipetteres 2 ml fra filtermaterialets vandige del.

Pladerne inkuberes ved 37 ± 1 °C og der aflæses efter 4, 7 og 10 dage.

Vandværker med angivelse af prøvetyper

Vandværk	Prøvetype			
	Afgangsvand	Biofilm fra kant af filter	Filtermateriale	Ledningsvand
Vestforsyning, Vand, Holstebro	X	X	X	X
Hjørring Vandværk	X	-	X	X
Esbjerg Kommune, Forsyningen	X	-	X	X
Aalborg Kommunnale Vandforsyning	X	-	-	2 X
Århus Kommunale Værker	X	X	X	X
Odense Vandselskab a/s	X	-	-	2 X
Slagelse Kommunnale Vandforsyning	X	X	X	X
Næstved Vandforsyning	X	X	X	X
Nykøbing-Rørvig Kommune, Vandforsyningen, Nykøbing Sj	X	-	X	X
Brøndby Kommune	X	X	X	X
Maribo Kommunale Værker	X	X	X	X
Humlum Vandværk, Struer	X	X	X	X
Frejlev Vandværk, Ålborg SV	X	-	-	X
Aalestrup Vandværk	X	X	X	X
Boeslum Bakker Vandværk I/S, Ebeltoft	X	X	X	X
Hammerum Vandværk, Herning	X	X	X	X
Dronningborg Vandværk I/S, Randers	X	X	X	X
Fjeldvigs Vandværk, Vejle	X	X	X	X
Børkop Vandværk I/S	X	X	X	X
Gram Vandværk	X	-	-	X
Hårby Vandværk	X	X	X	X
Strib Vandværk	X	-	-	X
Kildekrog Vandværk, Hornbæk	X	-	-	X
Vindinge Vandværk, Roskilde	X	X	X	X
Søndersø Vandværk, Københavns Energi	X	-	-	X
Torsbro Vandværk, Ishøj, Københavns Energi	X	-	-	X
Islevbro Vandværk, Islev, Københavns Energi	X	-	-	X
Horsens kommune, Vandforsyningen	-	-	-	X
Energi Randers Vand A/S	-	-	-	X
Galten Vandværk	-	-	-	X
Viborg Vand	-	-	-	X
Kolding Kommunale Vandforsyning	-	-	-	X
Albertslund Kommune, Vandforsyningen	-	-	-	X
Frederiksberg Vand	-	-	-	X
Hørsholm Kommunale Vandværk	-	-	-	X

Udvalgte data på vand fra de undersøgte vandværker

Der er ved stikprøve indhentet oplysninger fra 18 af de 27 undersøgte vandværker for at dokumentere variationen grundet forskellige geologiske betingelser.

Vandværk	Jern, total, mg Fe/l	Calcium, mg/l	Inddampningsrest, Tørstof mg/l	NVOC, mg C/l	pH	Lednings- evne, mS/m	Coliforme bakterier, cfu/100ml	Kimtal 22 °C, cfu/ml	Kimtal 37 °C, cfu/ml
Vestforsyning, Vand, Holstebro	0,06	73	320	1,5	8,47	50,6	<1	4	<1
Esbjerg Kommune, Forsyningen	0,069	46,6	212	0,53	7,8	39,2	<1	<1	<1
Århus Kommunale Værker	0,049	110	575	-	7,7	97,8	<1	14	4
Odense Vandselskab a/s	0,057	86	395	1,3	7,9	67,2	<1	<1	<1
Slagelse Kommunnale Vandforsyning	0,016	102	583	2,5	7,5	100	-	3	1
Næstved Vandforsyning	0,007	-	-	-	8,0	65	-	<1	<1
Nykøbing-Rørvig Kommune, Vandforsyningen, Nykøbing Sj	<0,005	69	453	4,1	7,9	79	-	39	<1
Maribo Kommunale Værker	2,7	99	468	1,7	7,24	77	-	-	-
Humlum Vandværk, Struer	0,022	46	232	-	7,8	35,0	<1	12	<1
Frejlev Vandværk, Ålborg SV	<0,010	-	-	1,0	7,9	40,8	<1	7	<1
Aalestrup Vandværk	0,089	-	-	-	8,0	43,7	<1	14	-
Boeslum Bakker Vandværk I/S, Ebeltoft	<0,010	90	368	1,7	7,9	55,4	<1	4	<1
Hammerum Vandværk, Herning	0,04	-	-	0,9	7,9	36,3	<1	<1	<1
Dronningborg Vandværk I/S, Randers	<0,010	-	-	-	8,0	52,8	<1	2	-
Fjeldvigs Vandværk, Vejle	0,060	71	326	1,5	7,8	50,3	<1	30	2
Gram Vandværk	0,03	-	-	1,0	7,4	51,2	<1	3	<1
Hårby Vandværk	0,031	-	-	1,2	7,6	49,7	<1	<1	<1
Kildekrog Vandværk, Hornbæk	0,02	-	-	2,0	7,6	70,0	<1	1	<1
Interval	<0,005 – 2,7	46 - 110	212 - 583	0,5 – 4,1	7,2 – 8,5	35 - 100	<1	<1 - 39	<1 – 4

Screening af afgangsvand, flowskema

Flowskema og beskrivelse af modificeret DS 3029

Med det samme Rystebord, 1 t, Ila	I
↓	
Udså 0,1 ml på GVPC og MWY	
↓	
3 x 2,0 ml af Ila i eppendorfrør	II
↓	
Centrifugeres	
↓	
Fjern 1,7 ml fra rør 1	
Fjern 1,7 ml fra rør 2	
Fjern 1,8 ml fra rør 3	
↓	
Whirlmix og udså 0,1 ml på GVPC og MWY fra rør 1	
↓	
Rør 2 sættes i vandbad 50 °C, 30 min →	Udså 0,1 ml på GVPC og MWY IV
↓	
Rør 3 tilsættes 1,8 ml syrebuffer	
↓	
Henstår 5 min	
↓	
Whirlmix og udså 0,1 ml på GVPC og MWY	III

Alle plader inkuberes og aflæses som flg.:

<p>INKUBERING 37,0 ± 1,0°C i lukkede plastposer.</p> <p>AFLÆSNING Aflæs efter ca. 4 og ca. 7 dage. Slut aflæs efter 10 dage. Typiske kolonier er konvekse, helrandede, glinsende med kornet overflade ("Knust glas") – se evt. under stereomikroskop. Grå, hvide, blå-violette eller lime-grønne. Nogle kan fluorescere. Kolonierne er små (pin-point) efter 2 – 3 dage, men vokser derefter til ca. 3 – 4 mm. Ved mikroskopi ses tynde, slanke stave op til filamentøse.</p> <p>VERIFIKATION Indgik ikke, da der ikke var fund af suspekter <i>Legionella</i>.</p>
--

Fire trin indgår i analysen af vandprøver

- **I. Membranfiltrering (1. opkoncentrering):** 10 l filtreres på vandværket og filter overføres til bluecapflaske med 20 ml sterilt ledningsvand. Flasken

rystes på rystebord ved 200 rpm i 60 ± 5 minutter. Herved koncentrerer prøven 500 X. 0,1 ml udsås på overfladen af GVPC og MWY agar.

- **II. Centrifugering (2. opkoncentrering):** 2 ml af den opkoncentrerede prøve (I) afpipetteres i et sterilt Eppendorfrør, der centrifugeres ved 8000 g i $5 \pm 0,5$ minutter. Efter centrifugering afpipetteres (fjernes) 1,7 ml supernatant. Herved opkoncentrerer prøven yderligere 6,7 X. Den resterende prøvemængde (0,3 ml) rystes på whirlmixer. 0,1 ml udsås på overfladen af GVPC og MWY agar.
- **III. Syrebehandling:** 2 ml af den opkoncentrerede prøve (I) afpipetteres i et sterilt Eppendorfrør, der centrifugeres ved 8000 g i $5 \pm 0,5$ minutter. Efter centrifugering afpipetteres (fjernes) 1,8 ml supernatant. Herved opkoncentrerer prøven yderligere 10 X. Den resterende prøvemængde (0,2 ml) rystes på whirlmixer. Til de 0,2 ml tilsættes 1,8 ml syrebuffer pH 2,2. Herved fortyndes prøven 10 X. Henstand ved stuetemperatur i $5 \pm 0,5$ minutter. 0,1 ml udsås på overfladen af GVPC og MWY agar.
- **IV. Varmebehandling:** 2 ml af den opkoncentrerede prøve (I) afpipetteres i et sterilt Eppendorfrør, der centrifugeres ved 8000 g i $5 \pm 0,5$ minutter. Efter centrifugering afpipetteres (fjernes) 1,7 ml supernatant. Herved opkoncentrerer prøven yderligere 6,7 X. Den resterende prøvemængde (0,3 ml) rystes på whirlmixer. Røret sættes i vandbad ved 50 ± 1 °C i 30 ± 2 minutter. 0,1 ml udsås på overfladen af GVPC og MWY agar.

Prøver af biofilm og filtermateriale

- Svaberpindene udstryges direkte på plader med GVPC og MWY agar.

Fem trin indgår i analysen af filtermateriale

- **0. Direkte udsæd:** 0,1 ml udsås på overfladen af GVPC og MWY agar. Hvis konsistensen tillader det, foretages direkte udsæd fra den ufertyndede prøve ellers fra fortyndet prøve.
- **I. direkte udsæd efter rystebord, II. centrifugering, III. Syrebehandling og IV. Varmebehandling:** Foretages som til analyse af vandprøven med den modifikation at der afpipetteres 2 ml fra filtermaterialets vandige del.

Pladerne inkuberes ved 37 °C ± 1 °C og der aflæses efter 4, 7 og 10 dage.

Screening af ledningsvand, flowskema

Den endelige screening af ledningsvand Flowskema og beskrivelse af modificeret DS 3029

Med det samme Rystebord, 1 t, IIa	I
↓ Udså 0,1 ml på GVPC	
↓ 2,0 ml af IIa i eppendorfrør	II
↓ Centrifugeres	
↓ Fjern 1,6 ml fra rør	
↓ Whirlmix og udså 0,1 ml på GVPC	
↓ Røret med 0,25 ml sættes i vandbad 50 °C, 30 min →	udså 0,1 ml på GVPC IV
↓ Rør med 0,050 ml tilsættes 0,450 ml syrebuffer	
↓ Henstår 5 min	
↓ Whirlmix og udså 0,1 ml på GVPC	III
↓ Filter placeres i tom steril flaske og dækkes med syrebuffer	VI
↓ Henstår i 5 min	
↓ Filter på GVPC	

Alle plader inkuberes og aflæses som flg.:

INKUBERING

37,0 ± 1,0 °C i lukkede plastposer.

AFLÆSNING

Aflæs efter ca. 4 og ca. 7 dage. Slutaflæs efter 10 dage.

Typiske kolonier er konvekse, helrandede, glinsende med kornet overflade ("Knust glas") – se evt. under stereomikroskop. Grå, hvide, blå-violette eller lime-grønne. Nogle kan fluorescere. Kolonierne er små (pin-point) efter 2 – 3 dage, men vokser derefter til ca. 3 – 4 mm. Ved mikroskopi ses tynde, slanke stave op til filamentøse.

VERIFIKATION

Min. 3 kolonier: vækst på BCYE, ingen vækst på BA, 37,0 ± 1,0 °C, min. 2 døgn. Agglutination (*L. pneumophila* sg. 2-14 samt efter behov *L. pneumophila* sg. 1 og øvrige *Legionella*)

Fem trin indgår i analysen af vandprøver

I. Membranfiltrering (1. opkoncentrering): 10 l filtreres på vandværket og filter overføres til bluecapflaske med 20 ml sterilt ledningsvand. Flasken rystes på rystebord ved 200 rpm i 60 ± 5 minutter. Herved koncentrerer prøven 500 X. 0,1 ml udsås på overfladen af GVPC agar.

II. Centrifugering (2. opkoncentrering): 2 ml af den opkoncentrerede prøve (I) afpipetteres i et sterilt Eppendorfrør, der centrifugeres ved 8000 g i 5 ± 0,5 minutter. Efter centrifugering afpipetteres (fjernes) 1,6 ml supernatant. Herved opkoncentrerer prøven yderligere 5 X. Den resterende prøvemængde (0,4 ml) rystes på whirlmixer. 0,1 ml udsås på overfladen af GVPC agar.

III. Syrebehandling: 2 ml af den opkoncentrerede prøve (I) afpipetteres i et sterilt Eppendorfrør, der centrifugeres ved 8000 g i 5 ± 0,5 minutter. Efter centrifugering afpipetteres (fjernes) 1,6 ml supernatant. Herved opkoncentrerer prøven yderligere 5 X. Den resterende prøvemængde (0,4 ml) rystes på whirlmixer. Til 50 µl ml tilsættes 450 µl syrebuffer pH 2,2. Herved fortyndes prøven 10 X. Henstand ved stuetemperatur i 5 ± 0,5 minutter. 0,1 ml udsås på overfladen af GVPC agar.

IV. Varmebehandling: 2 ml af den opkoncentrerede prøve (I) afpipetteres i et sterilt Eppendorfrør, der centrifugeres ved 8000 g i 5 ± 0,5 minutter. Efter centrifugering afpipetteres (fjernes) 1,6 ml supernatant. Herved opkoncentrerer prøven yderligere 5 X. Den resterende prøvemængde (0,4 ml) rystes på whirlmixer. Et rør med 250 µl sættes i vandbad ved 50 ± 1 °C i 30 ± 2 minutter. 0,1 ml udsås på overfladen af GVPC agar.

VI. Syrebehandling af filtre: Filter placeres i tom steril flaske og dækkes med syrebuffer. Dette henstår i 5 min. Herefter lægges filter på GVPC agar.

Pladerne inkuberes ved 37 ± 1 °C og der aflæses efter 4, 7 og 10 dage. Typiske kolonier (min. 3 stk.) verificeres ved vækst på BCYE og ingen vækst på BA ved 37,0 ± 1,0 °C, min. 2 dage.

Beregninger til opkoncentreringsgrader, beregningsfaktorer, detektionsgrænser og resultatangivelse

Opkoncentreringsgrad: Prøvemængde/mængde efter opkoncentrering.
 Faktor til beregning af antal cfu i 1 liter: $F = 1000 \text{ ml/ml originalprøve}$ repræsenteret i udsædsmængde, hvor ml originalprøve = opkoncentreringsgrad x udsædsmængde.

Detektionsgrænse: $< 1 \times$ Faktor til beregning af antal cfu i 1 liter.

Tabel 1 Afgangsvand

	Opkoncentreringsgrad	Faktor til beregning af antal cfu i 1 liter	Detektionsgrænse
Membranfiltrering	$10.000 \text{ ml} / 20 \text{ ml} = 500$	$1000 / 50 = 20$ (ml originalprøve = $500 \times 0,1 = 50$)	$< 1 \times 20 = <20$ cfu/liter
Centrifugering	$2 \text{ ml} / 0,3 \text{ ml} = 6,7$ $500 \times 6,7 = 3333$	$1000 / 333,3 = 3$ (ml originalprøve = $3333 \times 0,1 = 333,3$)	$< 1 \times 3 = <3$ cfu/liter
Syrebehandling	$2 \text{ ml} / 0,2 = 10$ Fortyndes herefter: $2 \text{ ml} / 0,2 = 10$, dvs. opkoncentreringsgraden er uændret 500 som efter membranfiltreringen	$1000 / 50 = 20$ (ml originalprøve = $500 \times 0,1 = 50$)	$< 1 \times 20 = <20$ cfu/liter
Varmebehandling	$2 \text{ ml} / 0,3 \text{ ml} = 6,7$ $500 \times 6,7 = 3333$	$1000 / 333,3 = 3$ (ml originalprøve = $3333 \times 0,1 = 333,3$)	$< 1 \times 3 = <3$ cfu/liter

Tabel 2 Ledningsvand

	Opkoncentreringsgrad	Faktor til beregning af antal cfu i 1 liter	Detektionsgrænse
Membranfiltrering	$10.000 \text{ ml} / 20 \text{ ml} = 500$	$1000 / 50 = 20$ (ml originalprøve = $500 \times 0,1 = 50$)	$< 1 \times 20 = <20$ cfu/liter
Centrifugering	$2 \text{ ml} / 0,4 \text{ ml} = 5$ $500 \times 5 = 2500$	$1000 / 250 = 4$ (ml originalprøve = $2500 \times 0,1 = 250$)	$< 1 \times 4 = <4$ cfu/liter
Syrebehandling	$2 \text{ ml} / 0,4 = 5$ Fortyndes herefter: $0,5 \text{ ml} / 0,05 = 10$ dvs. i alt $500 \times (5/10) = 250$	$1000 / 25 = 40$ (ml originalprøve = $250 \times 0,1 = 25$)	$< 1 \times 40 = <40$ cfu/liter
Varmebehandling	$2 \text{ ml} / 0,4 \text{ ml} = 5$ $500 \times 5 = 2500$	$1000 / 250 = 4$ (ml originalprøve = $2500 \times 0,1 = 250$)	$< 1 \times 4 = <4$ cfu/liter

Resultatangivelse og beregning:

DS 3029 foreskriver analyse af 1 liter vand, hvor detektionsgrænsen bliver <10 cfu/liter. I denne screening er der undersøgt 10 liter vand med en detektionsgrænse på hhv. <3 cfu/liter og <4 cfu/liter for afgangsvand og ledningsvand. I tabel 1 og tabel 2 ses detektionsgrænserne for hver af de fire trin, der indgår i analysen. Forskellene i detektionsgrænser på de to prøvetyper er rent analyseteknisk, da der ved opkoncentreringstrinnene: centrifugering, syrebehandling og varmebehandling er udtaget forskellige mængder for de to prøvetyper.

Detektionsgrænserne er altså lidt forskellige for vand fra vandværk og ledningsnet, men begge typer prøver afreporteres med den højeste detektionsgrænse <4 cfu/liter, for at få ensartethed i diskussionen af resultaterne.

Eksempel:

Ved fund af 1 suspekt koloni efter syrebehandling svarer det til 40×1 cfu pr. liter = 40 cfu/liter.

Resultaterne for biofilm og filtermateriale betragtes kvalitativt. Der er tale om hhv udstrykning af svaber og udsæd af opslæmmet vand fra filtermateriale.