



Harm Veenendaal, Kiwa Water Research
Dick van der Kooij, Kiwa Water Research

Een specifieke kweekmethode voor *Legionella pneumophila*

Het Waterleidingbesluit schrijft corrigerende acties voor wanneer *Legionella* in leidinginstallaties wordt aangetroffen. Hierbij wordt geen onderscheid gemaakt tussen *Legionella pneumophila* en andere soorten, zoals de in Nederland veel gekweekte *Legionella anisa*, die slechts zeer incidenteel bij mensen ziekte veroorzaakt. In dit artikel beschrijven we de ontwikkeling van een aangepaste kweekmethode die in leidingwatermonsters alleen *L. pneumophila* aantoon, gebaseerd op een verhoogde pH van de voedingsbodem én een hogere incubatietemperatuur (respectievelijk pH 7,35 en 40°C). Uitsluitend verhoging van de pH of de incubatietemperatuur verhinderde weliswaar de groei van *L. anisa* op de BCYE-voedingsbodem, maar bleek onvoldoende om de groei van andere nonpneumophila-soorten te verhinderen. Aanbevolen wordt om een normvoorschrift op te stellen van de kweekmethode voor *L. pneumophila*, waardoor routinematige toepassing mogelijk wordt.

Naar aanleiding van de uitbraak van legionellose in Bovenkarspel in 1999 is de Tijdelijke Regeling Legionellapreventie opgesteld⁸⁾. Deze regeling verplichtte de eigenaren van alle collectieve leidingwaterinstallaties tot het uitvoeren van een risico-analyse en zo nodig het opstellen van een beheersplan. Aanbevolen werd om het effect van de maatregelen te controleren met betrekking tot periodiek onderzoek op *Legionella*. In 2004 verscheen een wijziging van het Waterleidingbesluit⁹⁾. Hierin is voorge-

schreven dat, aanvullend op de risico-analyse en beheersmaatregelen, elke installatie die onder deze wettelijke regeling valt, periodiek moet worden bemonsterd om aan te tonen dat *Legionella* afwezig is (minder dan 100 kolonievormende eenheden per liter).

Voor monsterneming en analyse van *Legionella* in leidingwater geldt de Nederlandse norm NEN 6265⁴⁾. In dit normblad wordt de semi-selectieve voedingsbodem Buffered Charcoal Yeast Extract (BCYE) agar voorgeschreven. De pH van deze

voedingsbodem wordt gesteld op pH 6,9 ± 0,05, gemeten bij 50°C. Het stellen van de pH van de voedingsbodem op pH 6,9 ± 0,1 bij 25°C bleek meer monsters op te leveren waarin *Legionella* werd aangetroffen³⁾. Dit heeft geresulteerd in een wijzigingsblad bij NEN 6265⁵⁾. In Nederland en ook elders in Europa spelen de non-pneumophilasoorten ten opzichte van *L. pneumophila* echter geen rol van betekenis als ziekteverwekker⁷⁾. Daarom werd besloten om een specifieke kweekmethode te ontwikkelen voor de detectie van *L. pneumophila*.

Tabel 1. Groei van verschillende legionellasoorten op BCYE-voedingsbodems met verschillende pH-waarden.

legionellasoort	pH van de voedingsbodem													
	6,09	6,29	6,50	6,79	6,91	7,03	7,21	7,27	7,34	7,42	7,51	7,62	7,80	7,92
<i>L. pneumophila</i> serogroep 1	-	±	+	+	+	+	+	+	+	+	±	-	-	-
<i>L. pneumophila</i> serogroep 3	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	±	±	-
<i>L. pneumophila</i> serogroep 6	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	±	±	±
<i>L. bozemanii</i> serogroep 1	±	+	+	+	±	±	±	±	-	-	-	-	-	-
<i>L. bozemanii</i> serogroep 2	±	+	+	+	±	±	±	±	-	-	-	-	-	-
<i>L. longbeachae</i> serogroep 2	-	-	±	+	+	+	±	±	-	-	-	-	-	-
<i>L. gormanii</i>	-	±	±	+	+	+	±	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. dumoffii</i>	±	+	+	+	+	±	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. micdadei</i>	-	±	+	+	+	+	+	±	-	-	-	-	-	-
<i>L. jordanis</i>	-	±	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>L. anisa</i>	-	±	+	±	±	±	-	-	-	-	-	-	-	-

+ = optimale groei, ± = groei, maar significant minder dan bij de optimum groei, - = geen groei

Opzet en uitvoering van het onderzoek

In het onderzoek is de groei onderzocht van een aantal legionella-soorten op BCYE-agar met verschillende pH-waarden. Vervolgens is de groei bij verschillende temperaturen onderzocht en bij verschillende combinaties van beide kweekomstandigheden. De methode met de optimale combinatie van pH en temperatuur is getest op een aantal watermonsters, waarbij de resultaten zijn vergeleken met die van de standaardmethode.

De legionellasoorten waarmee de invloed van de aangepaste voedingsbodems op de opbrengst is bepaald, zijn: *L. pneumophila* serogroep 1 (eigen isolaat, afkomstig uit een leidinginstallatie), *L. pneumophila* serogroep 3 (ATCC 33155), *L. pneumophila* serogroep 6 (ATCC 33215), *L. dumoffii* (ATCC 33279), *L. longbeachae* serogroep 2 (ATCC 33484), *L. anisa* (ATCC 35292), *L. bozemanii* serogroep 1 (ATCC 33545), *L. bozemanii* serogroep 2 (ATCC 33217), *L. jordanis* (ATCC 33623), *L. micdadei* (ATCC 33218) en *L. gormanii* (ATCC 33297). De organismen werden maximaal drie dagen opgekweekt bij 37°C op het standaard BCYE-voedingsbodem zonder antibiotica (pH 6,9 ± 0,1). Vervolgens werden suspensies gemaakt waarvan verschillende verdunningen in veelvoud werden ingevroren bij -80°C. Bepaald is in welke verdunningen van de ingevroren suspensies na uitspatelen 50 tot 300 kolonievormende eenheden (kve) aanwezig waren op de BCYE-voedingsbodem. Deze verdunningen zijn in het verdere onderzoek gebruikt. De significantie van het verschil tussen de opbrengsten werd bepaald met behulp van de T-toets (tweezijdig getoetst, $\alpha = 2,5\%$ ¹⁾.

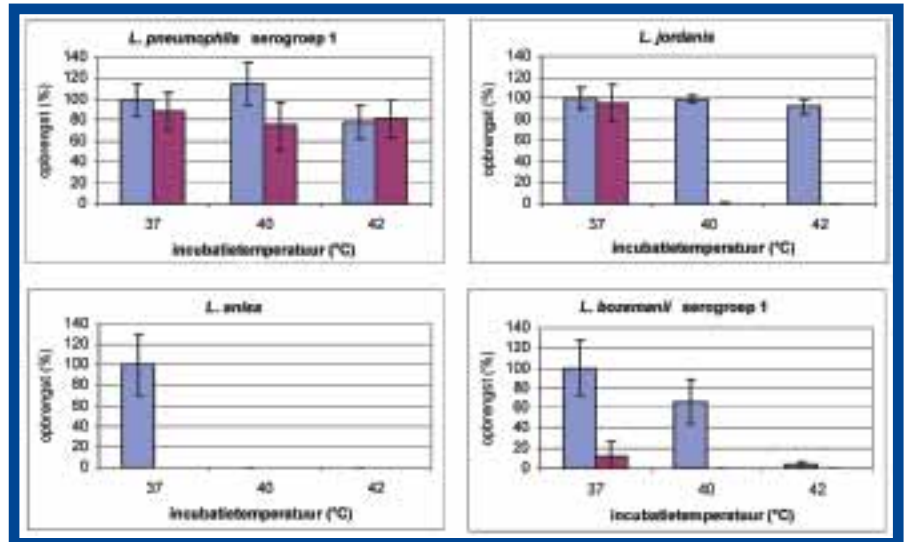
Invloed van de pH van de voedingsbodem

Voedingsbodems van BCYE-agar werden gemaakt volgens NEN 6265, zonder toevoeging van antibiotica en de pH (gemeten bij 25°C) werd gesteld op een range van waarden zoals weergegeven in tabel 1. Deze pH-waarden werden bereikt door meer of minder kaliumhydroxide toe te voegen dan in NEN 6265 is voorgeschreven. De voedingsbodems werden steeds in viervoud beënt met 0,1 ml van de bereide diepvriessuspensies. Na incubatie gedurende zeven dagen bij 37 ± 1°C werden de kolonies op alle voedingsbodems geteld.

Tabel 2. Groei van verschillende legionellasoorten bij verschillende incubatietemperaturen.

legionella-soort	incubatietemperatuur	
	40 ± 0,5°C	42 ± 0,5°C
<i>L. pneumophila</i> serogroep 1	o	o
<i>L. pneumophila</i> serogroep 3	o	<
<i>L. pneumophila</i> serogroep 6	o	o
<i>L. bozemanii</i> serogroep 1	o	<
<i>L. bozemanii</i> serogroep 2	<	<
<i>L. longbeachae</i> serogroep 2	<	<
<i>L. gormanii</i>	<	<
<i>L. dumoffii</i>	<	<
<i>L. micdadei</i>	o	<
<i>L. jordanis</i>	o	o
<i>L. anisa</i>	<	<

o = groei niet significant afwijkend van groei bij 37°C, < = significant mindere groei dan bij 37°C.



Afb. 1: Relatieve opbrengst van enkele legionellasoorten bij verschillende incubatietemperaturen en op voedingsbodems met verschillende pH-waarden. Linkerkolom; pH 6,90, rechterkolom; pH 7,35.

Uit de resultaten blijkt dat het groeioptimum van de meeste legionellasoorten lag tussen pH 6,79 en pH 7,03. Het groeioptimum voor de beide stammen van *L. bozemanii*, *L. dumoffii* en *L. anisa* lag bij een pH-waarde rond 6,50. *L. pneumophila* groeide bij een brede pH-range (6,50 tot 7,42) waarbij de opbrengst niet significant verschilde van de opbrengst bij het pH-optimum. Bij *L. gormanii*, *L. longbeachae* en *L. anisa* was het pH-traject met optimale groei echter relatief klein.

Op basis van deze resultaten kan geconcludeerd worden dat een pH-waarde van 7,35 ± 0,05 het meest onderscheidend is tussen *L. pneumophila* en de overige onderzochte legionellasoorten. Groei van *L. jordanis* en in mindere mate van *L. bozemanii*, *L. longbeachae* serogroep 2, *L. micdadei* en wellicht ook van andere niet-geteste soorten, blijft onder deze omstandigheden echter ook mogelijk.

Invloed van de kweektemperatuur

De voedingsbodems bereid volgens NEN 6265 (pH 6,9 ± 0,1, zonder toevoeging van antibiotica) werden in driefvoud beënt met 0,1 ml van de bereide diepvriessuspensies. Na incubatie gedurende zeven dagen

bij 37 ± 1°C, 40 ± 0,5°C en bij 42 ± 0,5°C werden de kolonies geteld. *L. pneumophila* serogroep 6 bleek niet in staat te groeien bij 42°C. *L. jordanis* bleek bij deze temperatuur nog wel te kunnen groeien (zie tabel 2). *L. anisa* groeide niet bij 40°C, maar naast de *L. pneumophila*-stammen groeiden bij deze temperatuur ook *L. bozemanii* serogroep 1, *L. micdadei* en *L. jordanis*. Op basis van alleen een hogere kweektemperatuur kan dus geen onderscheid worden gemaakt tussen *L. pneumophila* en andere legionellasoorten. Verhoging van de pH van de voedingsbodem naar pH 7,35 ± 0,05 in combinatie met verhoging van de kweektemperatuur tot 40 ± 0,5°C blijkt wel onderscheid te geven tussen *L. pneumophila* en de andere geteste legionellasoorten. De opbrengst van *L. pneumophila* op de voedingsbodem met pH 7,35, geïncubeerd bij een temperatuur van 40°C, is niet significant anders dan bij de in NEN 6265 voorgeschreven omstandigheden. Andere legionellasoorten werden onder de gewijzigde omstandigheden echter niet meer gekweekt (zie afbeelding 1).

Leidingwater

Leidingwatermonsters zijn onderzocht conform NEN 6265 en op BCYE-agar met pH 7,35, geïncubeerd bij 40°C. Van de kolonies (minimaal vijf per plaat) is het serotype bepaald (Oxid, DR800). Bij twaalf van de 30 monsters werd groei waargenomen op de voedingsbodems met pH 7,35, geïncubeerd bij 40°C (zie tabel 3). Serotyping wees uit dat het hier in alle gevallen *L. pneumophila* betrof. De overige 18 monsters vertoonden alleen groei op voedingsbodems met pH 6,90 en geïncubeerd bij 37°C. Serotyping van de kolonies wees uit dat geen van deze legionellabacteriën behoorden tot *L. pneumophila*. De aantallen *L. pneumophila* die gevonden werden op de voedingsbodem met pH 7,35 en geïncubeerd bij 40°C, kwamen overeen met de aantallen die gevonden werden onder de kweekomstandigheden volgens NEN 6265. Opvallend is dat bij drie monsters storende bijgroei op de voedingsbodems, die geïncubeerd werden bij 40°C, zodanig geremd werd dat *Legionella* kon worden

aangetoond terwijl dat bij de methode volgens NEN 6265 niet mogelijk was. Bij geen van deze monsters werd groei waargenomen van non-pneumophila-soorten op voedingsbodems met pH 6,90, geïncubeerd bij 40°C. Het is echter niet uit te sluiten dat in bepaalde watertypen legionellasoorten voorkomen die wel onder deze omstandigheden kunnen groeien (zie tabellen 1 en 2).

Conclusies en aanbevelingen

Met een BCYE-voedingsbodem met pH 7,35 ± 0,05 en incubatie bij 40 ± 0,5 °C is het mogelijk om alleen *L. pneumophila* te kweken zonder verlies van opbrengst ten opzichte van de standaard kweekmethode volgens NEN 6265. De andere onderzochte legionellasoorten blijken onder deze omstandigheden niet te

groeien. Aanbevolen wordt om ter bevestiging altijd een (serologische) typering uit te voeren van de kolonies, omdat (nog) niet geheel uit te sluiten valt dat niet in dit onderzoek onderzochte legionella-soorten ook onder deze kweekomstandigheden kunnen groeien. Het aantal uit te voeren (sero)typeringen zal echter afnemen, omdat uit beduidend minder leidingwatermonsters *Legionella* zal worden gekweekt. Toepassing van deze werkwijze maakt het mogelijk om gericht onderzoek uit te voeren naar de aan- of afwezigheid van *L. pneumophila*. Dit organisme is verreweg de voornaamste veroorzaker van legionellose in Nederland. Aanbevolen wordt om een normvoorschrift op te stellen van de kweekmethode voor *L. pneumophila*, waardoor routinematige toepassing mogelijk wordt.

Tabel 3. Invloed van incubatietemperatuur en pH van het BCYE-medium op de groei van Legionella in leidingwatermonsters.

aantal monsters	groei bij 37°C		groei bij 40°C		legionellasoort
	pH 6,90	pH 7,35	pH 6,90	pH 7,35	
18	+	-	-	-	non-pneumophila <i>L. pneumophila</i> <i>L. pneumophila</i>
9	+	+	+	+	
3	ntb	ntb	+	+	

ntb = niet te beoordelen door storende achtergrondgroei.

LITERATUUR

- 1) Baggelaar P. (1997). Syllabus toegepaste statistiek voor waterlaboratoria, 2e versie. KOA 98.085.
- 2) Gezondheidsraad (2003). Bestrijding van *Legionella*. Publicatie nr. 2003/12.
- 3) In 't Veld S. en J. de Wagt (2002). Snelle herziening van NEN 6265, legionella-onderzoek aanbevolen. H₂O nr. 9, pag 15-16.
- 4) NEN (1991). Bacteriologisch onderzoek van water. Onderzoek naar de aanwezigheid en aantal kolonievormende eenheden van legionellabacteriën. NEN 6265.
- 5) NEN (2003). Wijzigingsblad bij: Bacteriologisch onderzoek van water. Onderzoek naar de aanwezigheid en aantal kolonievormende eenheden van legionellabacteriën. NEN 6265/A1.
- 6) Oosterholt F. en D. van der Kooij (2003). *Legionella* in woninginstallaties. H₂O nr. 4, pag. 21-22.
- 7) Van der Kooij D., G. Wubbels en G. Veendaal (2007). Legionellabacteriën in leidingwaterinstallaties behoren meestal tot de ongevaarlijke soort *Legionella anisa*. H₂O nr. 5, pag. 33-35
- 8) VROM (2000). Modelbeheersplan legionella-preventie in leidingwater.
- 9) VROM (2004). Besluit van 26 oktober 2004 tot wijziging van het Waterleidingbesluit en het Besluit hygiëne en veiligheid badinrichtingen en zwemaangelegenheden (preventie van *Legionella* in leidingwater). Staatsblad 2004.576 *Legionella* in leidingwater). Staatsblad 2004.576