

Vergelijking isolatiemedia voor Legionella

HARM VEENENDAAL, KIWA WATER RESEARCH
SIMON IN 'T VELD, VITENS

Voor de detectie van Legionella in (drink)watermonsters wordt in Nederland de analysemethode toegepast zoals die beschreven is in NEN 6265[1]. De methode schrijft een specifieke voedingsbodem (BCYE) voor, waaraan componenten zijn toegevoegd om eventuele storende bijgroei te remmen. In de praktijk blijkt echter dat deze voedingsbodem niet goed bruikbaar is voor watermonsters waarin veel storende flora aanwezig is. In het internationaal gebruikte voorschrift ISO 11731[2] wordt een andere voedingsbodem (GVPC**) voorgeschreven. Onderzocht is of resultaten die met beide bodems bereikt worden, vergelijkbaar zijn en of ook Nederland niet beter de methode uit de ISO-norm kan overnemen. Het onderzoek is uitgebreid met een aantal andere in de literatuur beschreven selectieve voedingsbodems voor Legionella (GVPC, MWY*** en BMPα****), waarvoor de selectieve supplementen commercieel verkrijgbaar zijn. Uit dit onderzoek blijkt dat zeker voor relatief schone drinkwatermonsters de werkwijze volgens NEN 6265 de hoogste opbrengst van verschillende legionellasoorten geeft. Storende bijgroei wordt door één van de andere voedingsbodems (het MWY-medium) het best geremd, maar deze voedingsbodem geeft een lagere opbrengst van Legionella. De voedingsbodem, zoals beschreven in de ISO-norm, geeft geen verbetering ten opzichte van de voedingsbodem die in de NEN-norm beschreven is.*

In 1981 beschreef Edelstein[5] een semi-selectieve voedingsbodem voor de isolatie van *Legionella* uit verontreinigd klinisch en milieumateriaal. Deze voedingsbodem heeft later als uitgangspunt gediend voor zowel NEN 6265 als voor ISO 11731. Aan een basismedium wordt volgens NEN polymixine-B-sulfaat (voornamelijk gericht tegen Gram-negatieve bacteriën), natriumcefazoline (breedspectrum antibioticum) en pimaricine (gericht tegen schimmels) toegevoegd om de voedingsbodem semi-selectief te maken. Het ISO-medium bevat eveneens polymixine-B-sulfaat en daarnaast glycine, vancomycine (voornamelijk gericht tegen Gram-negatieve bacteriën) en cycloheximide. Het is onvermijdelijk dat de groei van *Legionella* door deze toevoegingen ook enigszins zal worden geremd. Door het verschil in samenstelling kan verwacht worden dat remming van *Legionella* niet in gelijke mate zal optreden. Eerder vergelijkend onderzoek[6],[8],[10] geeft tegenstrijdige resultaten.

Naast de samenstelling van de voedingsbodem bleek eerder al dat ook de zuurgraad van de voedingsbodem van invloed is op de opbrengst van *Legionella*. *L. pneumophila* is minder gevoelig voor schommelingen in de zuurgraad dan de overige legionellasoorten[7]. In een aanvullingenblad bij NEN 6265[3] wordt een pH van de gestolde voedingsbodem voorgeschreven die 6,9 ± 0,1 bedraagt. ISO-norm 11731 schrijft een pH voor van 6,9 ± 0,4 en ISO-norm 11731-2 (methode voor water met lage concentratie *Legionella*) een pH van 6,8 ± 0,2.

Bij onderzoek van watermonsters uit leidingwater treedt in het algemeen weinig storende bijgroei op. Soms is het door storende bijgroei niet mogelijk een betrouwbaar resultaat te verkrijgen. Bij proceswatermonsters, zoals monsters van koelwater, is het hierdoor vaak onmogelijk *Legionella* te detecteren.

Opzet en uitvoering onderzoek

De geteste voedingsbodems zijn, zoals gezegd, samengesteld zoals is voorgeschreven in NEN 6265, ISO 11731 of door de fabrikant van de commercieel verkrijgbare selectieve supplementen[9]. De pH van de voedingsbodems is in alle gevallen gesteld op 6,9 ± 0,1 bij 25°C. Tevens is een BCYE-voedingsbodem bereid waaraan geen selectieve componenten zijn toegevoegd (zie tabel 1).

De legionellasoorten waarmee de opbrengst op de voedingsbodems is bepaald, zijn *Legionella pneumophila* serogroep 1 (eigen isolaat), *Legionella pneumophila* serogroep 3 (ATCC 33155), *Legionella pneumophila* serogroep 6 (ATCC 33215), *L. dumoffii* (ATCC 33279), *L. longbeachae* serogroep 1 (ATCC 33462), *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 zijn maximaal drie dagen opgekweekt bij 37°C op de BCYE-voedingsbodem zonder toegevoegde selectieve componenten. Vervolgens zijn suspensies gemaakt, waarvan verschillende verdunningen in veelvoud zijn ingevroren bij -80°C. Na invriezen is bepaald in welke verdunningen na uitspatelen 50 tot 300 kolonievormende eenheden aanwezig waren op het BCYE-medium zonder selectieve componenten.

Voor het vergelijkend onderzoek zijn de voedingsbodems in viervoud beënt met 0,1 ml van deze diepvriessuspensie. Na incubatie gedurende zeven dagen bij 37 ± 1°C zijn op alle voedingsbodems de kolonies geteld. Het experiment is eenmalig herhaald, waarbij alle voedingsbodems opnieuw bereid zijn en gebruik is gemaakt van dezelfde ingevroren legionella-

Tabel 1: Selectieve componenten in de verschillende voedingsbodems.

	BCYE niet-selectief	BCYE +selectief (=NEN)	BCYE +selectief (ISO)	BMPα (Oxoid)	GVPC (Oxoid)	MWY (Oxoid)
polymixine-B-sulfaat	-	+	+	+	+	+
cefazoline	-	+	-	-	-	-
cefamandole	-	-	-	+	-	-
pimaricine	-	+	-	-	-	-
anisomycine	-	-	-	+	-	+
vancomycine	-	-	+	-	+	+
cycloheximide	-	-	+	-	+	-
glycine	-	-	+	-	+	+

suspensies. Naast de opbrengst van de diverse legionellalabstammen is ook een aantal praktijk (koelwater)monsters onderzocht. Hiermee wordt inzicht gekregen in de selectiviteit van de voedingsbodems.

Resultaten en discussie

In tabel 2 zijn de resultaten weergegeven van de opbrengst op de verschillende voedingsbodems. De opbrengst op de voedingsbodem zonder selectieve componenten (BCYE) is steeds op 100 procent gesteld. De opbrengst op de selectieve voedingsbodems is berekend als procentuele opbrengst ten opzichte van de opbrengst op de niet-selectieve voedingsbodem. Op de foto zijn de verschillende voedingsbodems met *L. jordanis* weergegeven. Duidelijk is te zien dat groei op de selectieve ISO- en BMPa-voedingsbodems geheel achterwege blijft en de groei op het selectieve NEN-medium duidelijk wordt geremd.

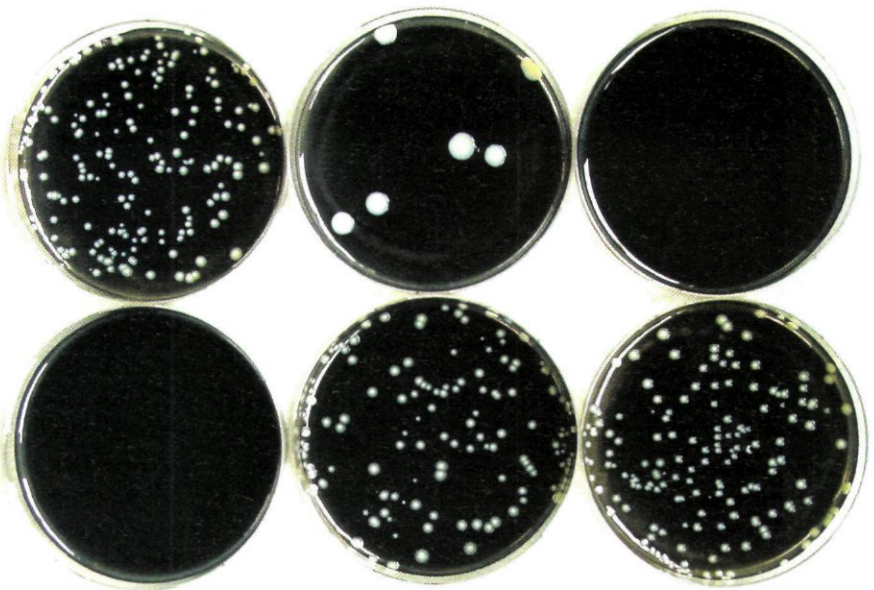
Met behulp van de T-toets, tweezijdig getoetst, $\alpha = 2{,}5\%$[4]) is berekend of een significant verschil kan worden aangetoond tussen de opbrengst op het BCYE-medium zonder selectieve toevoegingen en de voedingsbodems met selectieve toevoegingen uit tabel 1. In tabel 2 is tevens aangegeven welke opbrengst significant afwijkend is (vet).

Uit de resultaten blijkt dat nagenoeg alle onderzochte legionellasoorten op tenminste één van de selectieve voedingsbodems geremd worden. Door de relatief hoge spreidingen tussen de koloniegetallen in elk experiment is de significantie van de remming niet steeds identiek. Stammen waarbij volledige remming optrad zijn nogmaals herhaald. Uit de herhaling bleek dat *L. jordanis* en *L. micdadei* wel enige groei op het ISO-medium lieten zien. Significante remming komt het meest voor op het selectieve ISO-medium (15x lager) en op de drie voedingsbodems van Oxoid (BMPα 13x significant lager, GVPC 12x significant lager en MWY 8x significant lager). De selectieve BCYE-voedingsbodem volgens NEN vertoont vier maal een significant lagere opbrengst (voor *L. jordanis* en *L. micdadei*) dan op de voedingsbodem zonder selectieve componenten. Opvallend is dat de in beginsel identieke zelf samengestelde voedingsbodems volgens ISO en het commercieel verkrijgbare GVPC-medium niet dezelfde remming van de verschillende stammen laten zien. De oorzaak hiervan is niet duidelijk.

Een enkele keer komt het voor dat de opbrengst op de selectieve voedingsbodem significant hoger is dan op de niet-selectieve voedingsbodem. Het meest komt dit voor bij de voedingsbodem volgens NEN (vier maal) maar ook eenmaal op de overige voedingsbodems (met uitzondering van het ISO-medium).

Volledige remming van de teststammen komt voor op het selectieve NEN-medium (*L. micdadei*), het ISO-medium (*L. jordanis* en *L. micdadei*, hoewel dit niet altijd reproduceerbaar is) en op het BMPα-medium (*L. jordanis*, *L. micdadei* en de beide serogroepen van *L. bozemanii*).

Opbrengst van L. jordanis op de verschillende voedingsbodems. Bovenste rij v.l.n.r. BCYE zonder selectieve componenten, BCYE met selectieve componenten volgens NEN en het selectieve ISO-medium. Onderste rij v.l.n.r: de media BMPα, GVPC en MWY.



Tabel 2: Relatieve opbrengst, met standaardafwijking, op de diverse voedingsbodems voor beide experimenten. De waarden die vet aangegeven zijn, verschillen significant van de opbrengst op het BCYE-medium zonder selectieve componenten.

	BCYE niet-selectief	BCYE +selectief (=NEN)	BCYE +selectief (ISO)	BMPα (Oxoid)	GVPC (Oxoid)	MWY (Oxoid)
L. pneumophila	100 ± 6	107 ± 6	**45 ± 8**	**75 ± 3**	**79 ± 11**	86 ± 5
serogroep 1	100 ± 17	105 ±19	**54 ± 3**	**69 ± 8**	95 ± 4	**80 ± 12**
L. pneumophila	100 ± 25	90 ± 18	69 ± 22	73 ± 10	75 ± 8	86 ± 18
serogroep 3	100 ± 20	103 ± 14	62 ± 17	88 ± 13	81 ± 28	71 ± 18
L. pneumophila	100 ± 20	110 ± 4	**60 ± 18**	92 ± 20	66 ± 21	76 ± 3
serogroep 6	100 ± 17	99 ± 12	**66 ± 16**	**64 ± 18**	74 ± 15	**64 ± 23**
L. dumoffii	100 ± 9	90 ± 6	**77 ± 12**	111 ± 7	**52 ± 10**	**60 ± 9**
	100 ± 9	92 ± 15	81 ± 12	98 ± 9	**47 ± 8**	**45 ± 8**
L. longbeachae	100 ± 8	88 ± 6	**68 ± 7**	**71 ± 6**	**52 ± 6**	70 ± 5
serogroep 1	100 ± 25	**111 ± 5**	65 ± 23	88 ± 10	**77 ± 2**	91 ± 11
L. longbeachae	100 ± 16	99 ± 15	80 ± 9	**54 ± 9**	94 ± 7	95 ± 11
serogroep 2	100 ± 20	**130 ± 6**	106 ± 10	122 ± 10	79 ± 17	114 ± 20
L. anisa	100 ± 5	91 ± 10	**75 ± 6**	88 ± 9	**78 ± 9**	**79 ± 4**
	100 ± 12	91 ± 5	114 ± 9	113 ± 6	**71 ± 6**	90 ± 2
L. gormanii	100 ± 9	117 ± 15	**47 ± 9**	**125 ± 7**	**35 ± 9**	**54 ± 8**
	100 ± 20	114 ± 12	**59 ± 7**	96 ± 3	**40 ± 8**	**49 ± 3**
L. jordanis	100 ± 16	**7 ± 3**	**0***	**0**	**77 ± 7**	94 ± 12
	100 ± 3	**66 ± 7**	**0***	**0**	101 ± 8	**123 ± 1**
L. micdadei	100 ± 7	**0**	**0***	**0**	87 ± 13	**81 ± 4**
	100 ± 3	**0**	**0***	**2 ± 2**	95 ± 14	98 ± 11
L. bozemanii	100 ± 8	99 ± 18	**7 ± 8**	**0**	87 ± 7	88 ± 14
serogroep 1	100 ± 19	101 ± 15	**39 ± 5**	**0**	**51 ± 16**	106 ± 5
L. bozemanii	100 ± 8	**122 ± 7**	102 ± 12	**0**	**119 ± 14**	107 ± 10
serogroep 2	100 ± 14	112 ± 28	109 ± 5	**0**	**72 ± 26**	119 ± 9

* Deze mate van remming bleek niet goed reproduceerbaar te zijn.

Opgemerkt moet worden dat het onderzoek is uitgevoerd met eerder in het laboratorium geïsoleerde en gekweekte legionella's. Dit is een beperkende factor in dit onderzoek. Legionella's die in het milieu voorkomen, kunnen mogelijk andere resultaten opleveren.

Bij het onderzoek naar de selectiviteit van de verschillende voedingsbodems bij praktijkmonsters zijn 13 koelwatermonsters onderzocht. De platen zijn beoordeeld op de aanwezigheid van legionellasoorten en op de mate van groei van andere micro-organismen (zie tabel 3).

De remming van bijgroei van de selectieve voedingsbodems volgens NEN, ISO en het BMPα-medium is minder efficiënt is dan van het GVPC- en MWY-medium. Daarnaast wordt op het GVPC- en MWY-medium meer *Legionella* aangetoond dan op de andere voedingsbodems.

Conclusies en aanbevelingen

Het selectieve NEN-medium blijkt voor drinkwatermonsters de beste keus te zijn, zeker ten opzichte van het selectieve ISO-medium.

De opbrengst van veel legionellasoorten is op het selectieve NEN-medium aanmerkelijk hoger dan op het selectieve ISO-medium. De remming van bijgroei op het selectieve ISO-medium is niet beter dan op het selectieve NEN-medium. De mate van geringe remming van storende bijgroei uit koelwatermonsters maakt het selectieve NEN-medium voor dit soort watermonsters echter minder geschikt. De beste voedingsbodems om remming van bijgroei te bewerkstelligen blijken de commercieel verkrijgbare GVPC- en MWY-voedingsbodems van Oxoid.

Worden de opbrengst en selectiviteitgegevens naast elkaar gelegd, dan kan geconcludeerd worden dat het selectieve NEN-medium het meest geschikt is voor relatief schone (drinkwater)monsters. Voor monsters waarin bijgroei verwacht wordt die de analyse kan verstoren, zoals dat het geval kan zijn in monsters van koelwater en ander proceswater, is de kans dat *Legionella* wordt aangetroffen het grootst op het MWY-medium. Omdat de opbrengst van een aantal legionellasoorten op deze voedingsbodem vaak significant lager is dan op het selectieve BCYE-medium, wordt aanbevolen om voor dit type watermonsters beide voedingsbodems te gebruiken.

LITERATUUR

1) *Anonymous (1991). NEN6265. Bacteriologisch onderzoek van water. Onderzoek naar de aanwezigheid en aantal kolonievormende eenheden (KVE) van Legionella-bacteriën. NNI.*
2) *Anonymous (1998). International Standard ISO 11731. Water quality-detection and enumeration of Legionella. First edition.*
3) *Anonymous (2003). NEN6265/A1. Wijzigingsblad. Bacteriologisch onderzoek van water. Onderzoek naar de aanwezigheid en aantal kolonievormende eenheden (KVE) van Legionella-bacteriën. NNI.*
4) *Baggelaar P. (1997). Syllabus toegepaste statistiek voor waterlaboratoria. Tweede versie. KOA 98.085.*
5) *Edelstein P. (1981). Improved semiselective medium for isolation of Legionella pneumophila from contaminated clinical and environmental specimens. Journal of Clinical Microbiology, pag. 298-303.*
6) *Edelstein P. (1982). Comparative study of selective media for isolation of Legionella pneumophila from potable water. Journal of Clinical Microbiology, pag. 697-699.*
7) *In 't Veld S. en J. de Wagt (2002). Snelle herziening van NEN 6265 legionella-onderzoek aanbevolen. H_2O nr. 9, pag. 15-16.*
8) *Kusnetsov ., M. Jaana, R. Hannele, . Jousimies-Somer, Aino I. Nevalainen en P. Martikainen (1994). Isolation of Legionella from water samples using various culture methods. Journal of Applied Bacteriology nr. 76, pag. 155-162.*
9) *Oxoid (1988). The Manual. 8th Edition pag. 2-120 - 2-123.*
10) *Reinthaler F., J. Sattler, K. Schaffler-Dullning, B. Weinmayr en E. Marth (1993). Comparative study of procedures for isolation and cultivation of Legionella pneumophila from tapwater in hospitals. Journal of Clinical Microbiology pag. 1213-1216.*

NOTEN

* BCYE = Buffered Charcoal Yeast Extract Agar
** GVPC = Glycine Vancomycin Polymixine Cycloheximide Agar
*** MWY = Modified Wadowsky Yee Agar
**** BMPα = Aces-Buffered Cefomandole Polymixine α-ketoglutarate Agar

Tabel 3: Beoordeling van groei van koelwatermonsters op de diverse selectieve voedingsbodems. - = geen of amper groei, ± = lichte bijgroei, + = veel bijgroei, (n) = aantal Legionella, [1] = L. pneumophila *serogroep 1,* [2] = L. pneumophila *serogroep 2-14,* [3] = *mengsel van* L. pneumophila *serogroep 1 en serogroep 2-14,* [4] = L. non-pneumophila.

monster	BCYE +selectief (=NEN)	BCYE +selectief (ISO)	BMPα (Oxoid)	GVPC (Oxoid)	MWY (Oxoid)
1	+	+	+	±	±
2	±	+	±	±	±
3	+	-	+	-	-
4	(15)[1] en (4)[4]	(9)[1]	(8)[1]	(14)[1]+(1)[4]	(13)[1]
5	±	+	±	-	+
6	+	+	+	±	±
7	+	+ en (1)[1]	± en (7)[4]	(2)[2]	-
8	(22)[1] en (372)[4]	(14)[1]	(9)[2] en (282)[4]	(22)[3] en (280)[4]	(20)[3] en (270)[4]
9	+	+	+	+	+
10	-	+	+	-	+
11	+ en (3)[1]	(2)[1]	+ en (1)[4]	(2)[1] en (2)[4]	(1)[1] en (1)[4]
12	+	±	+	+ en (1000)[4]	+ en (>1000)[4]
13	+	-	+	-	+