



Snelle herziening van NEN 6265 Legionella-onderzoek aanbevolen

ING S. IN 'T VELD, WATERLEIDING MAATSCHAPPIJ OVERIJSSSEL LABORATORIUM- EN PROCES TECHNOLOGIE BV
J. DE WAGT, WATERLEIDING MAATSCHAPPIJ OVERIJSSSEL LABORATORIUM- EN PROCES TECHNOLOGIE BV

Bij het onderzoek van water op de aanwezigheid van Legionella-bacteriën wordt in de Tijdelijke regeling Legionella-preventie verwezen naar NEN 6265. De afgelopen jaren is veel discussie ontstaan omtrent de nauwkeurigheid van deze methode. WMO Laboratorium- en Proces Technologie (L&PT) BV voerde samen met PWN onderzoek uit naar de werkwijzen binnen NEN 6265 die van invloed zijn op de nauwkeurigheid van de methode. Daaruit blijkt dat de zuurgraad van de toegepaste voedingsbodem 'Buffered Charcoal Yeast Extract agar (BCYE)' van invloed is op de groei van Legionella-bacteriën. In NEN 6265 staat uitvoerig beschreven op welke wijze BCYE moet worden bereid. Bij het stellen van de zuurgraad van de BCYE wordt in NEN 6265 een ongebruikelijke methode toegepast, waardoor de zuurgraad van de BCYE stijgt tot waarden waarbij Legionella-bacteriën worden geremd in hun groei. Een snelle aanpassing van NEN 6265 wordt dan ook aanbevolen. Deze aanbeveling is inmiddels binnen het Nederlands Normalisatie Instituut (NEN) besproken en een wijzigingsblad is in voorbereiding.

Na de Legionella-epidemie tijdens de Westfriese Flora in Bovenkarspel in 1999 ontstond een hausse in Legionella-analyses. In het kader van de door de overheid ingestelde Tijdelijke regeling Legionella-preventie^{1,2} wordt in Nederland naar schatting bij 600.000 publieke waterinstallaties een controle uitgevoerd op de aanwezigheid van Legionella. Die controle bestaat uit het analyseren van het water uit de koud- en of warm- waterinstallatie. Voor de

technische uitvoering van de analyse wordt verwezen naar NEN 6265 'Onderzoek naar de aanwezigheid en het aantal kolonievormende eenheden (KVE) van Legionella-bacteriën'³. Rond deze norm is de afgelopen jaren veel discussie geweest; met name de nauwkeurigheid van de methode is een veel besproken kwestie^{4,5}. Bij de door Kiwa georganiseerde ringonderzoeken is zeker ten opzichte van andere bepalingsmethoden bij de Legionella-analyse

sprake van een grotere spreiding. Een mogelijke oorzaak hiervan kan de gebruikte voedingsbodem zijn. In NEN 6265 staat uitvoerig beschreven op welke wijze de 'Buffered Charcoal Yeast Extract agar (BCYE)' moet worden bereid. Onder hoofdstuk 8.1.6 (Bereiding totaal medium) staat beschreven hoe uiteindelijk alle afzonderlijke componenten aan elkaar worden toegevoegd tot een compleet medium. Letterlijk staat in NEN 6265: "Los de ACES op in 450 ml gedestilleerd water onder verwarming tot ten hoogste 50°C. Meng het gistextract, de poederkool, de agar en de kaliumhydroxide-oplossing met 400 ml gedestilleerd water. Voeg beide oplossingen samen en autoclaveer gedurende 15 min bij 120°C. Koel af tot 50°C. Voeg oplossingen A t/m D aseptisch toe. Vul nu aan met steriel gedestilleerd water tot 1000 ml. Stel de pH op 6.90 ± 0.05. Giet 20 ml medium in petrischalen".

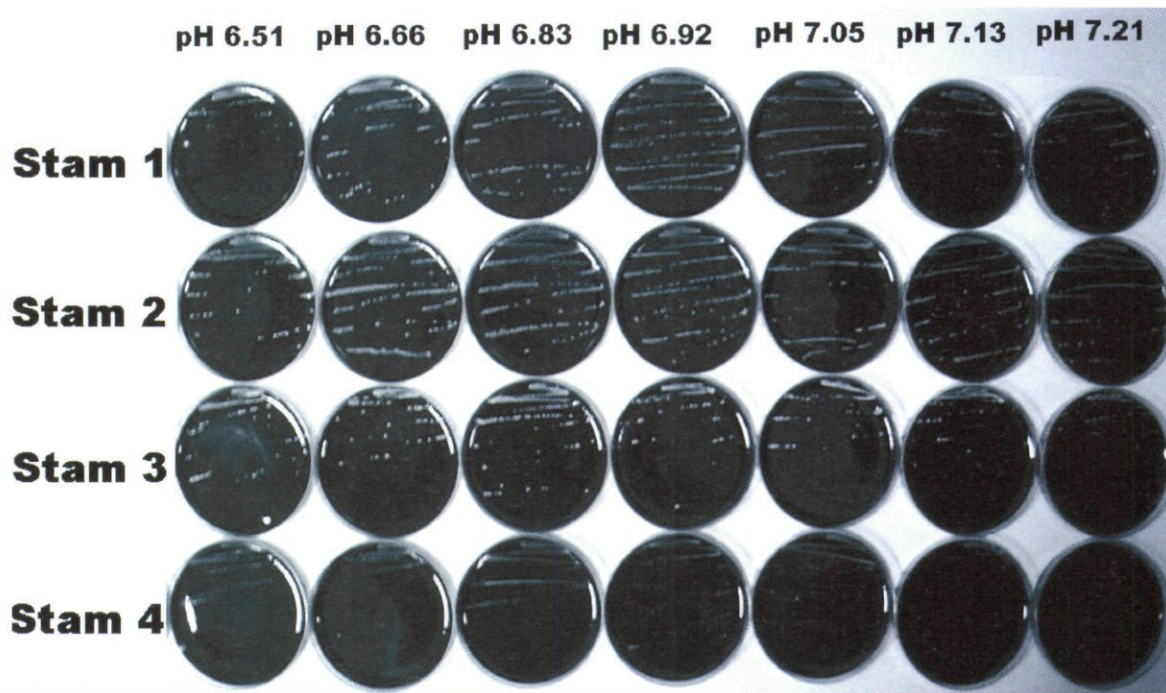
In de praktijk betekent dit, wanneer de werkwijze beschreven in de NEN exact wordt gevolgd, dat het medium tot 50°C wordt afgekoeld, de oplossingen worden toegevoegd, en voordat het medium wordt uitgetogen in petrischalen op een zuurgraad wordt gebracht van 6.90 ± 0.05. Na het uitvullen in petrischalen wordt de zuurgraad van de BCYE na 24 uur gemeten bij kamertemperatuur waarbij de zuurgraad varieert van 7.0 tot 7.4. Binnen de microbiologie is het stellen van een zuurgraad bij 50°C van voedingsbodems zeer ongewoon. Doorgaans wordt aangegeven dat een voedingsbodem na sterilisatie aan een bepaalde zuurgraad moet voldoen die wordt gemeten bij kamertemperatuur. In samenwerking met Provinciaal Waterleidingbedrijf Noord-Holland (PWN) voerde het laboratorium van WMO onderzoek uit naar de effecten van de zuurgraad van de BCYE. Met name is gekeken naar het effect van de zuurgraad van BCYE op de groei van vier verschillende Legionella-soorten die uit praktijkmonsters zijn geïsoleerd.

Opzet onderzoek

Bij het onderzoek wordt een hoeveelheid BCYE bereid, waar na sterilisatie met behulp

Tabel 1: Resultaten groei Legionella-soorten op BCYE met verschillende zuurgraad.

	stam 1 (Legionella pneumophila serogroep 1)			stam 2 (Legionella pneumophila serogroep 2-14)			stam 3 (Legionella non-pneumophila WMO)			stam 4 (Legionella non-pneumophila PWN)		
pH	2 dagen	4 dagen	6 dagen	2 dagen	4 dagen	6 dagen	2 dagen	4 dagen	6 dagen	2 dagen	4 dagen	6 dagen
6,51	1	2	9	2	7	12	1	10	11	2	7	12
6,66	2	12	12	3	12	12	2	9	9	2	4	12
6,83	3	12	12	5	12	12	3	11	11	3	7	12
6,92	4	12	12	6	12	12	3	8	12	3	3	11
7,05	2	10	12	5	12	12	2	7	9	3	3	8
7,13	1	5	12	5	12	12	2	7	10	1	2	2
7,21	1	5	7	5	12	12	2	4	10	geen groei	geen groei	1



Overzicht groei van *Legionella*-soorten op BCYE met verschillende pH-waarden na vier dagen incubatie bij 37°C.

van steriele 10 N HCl of 10 N NaOH voedingsbodems worden verkregen met een zuurgraad die varieert tussen 6.30 en 7.30. Na stolling wordt één dag na bereiding de zuurgraad van de verschillende platen gemeten. Vanuit praktijkmonsters worden *Legionella*-soorten verzameld die na isolatie gelijktijdig op een BCYE-plaat worden geënt gevolgd door een incubatie van vijf dagen. Vanaf de platen wordt bacteriologisch materiaal geënt, in een buis steriel onthard water. De verkregen suspensie wordt intensief gemixt, waardoor een goede homogene suspensie ontstaat. Vanuit deze suspensie wordt met behulp van een 10 µl öse een plaat beënt waarbij in totaal twaalf strepen zigzaggend over een voedingsbodem worden getrokken. Op deze wijze worden de verzamelde soorten op de diverse platen geënt. Vervolgens wordt elke twee dagen gekeken hoe de groei van de diverse soorten op de diverse platen zich ontwikkelt.

Daarbij wordt aangegeven tot en met welke entstreep de desbetreffende *Legionella*-bacterie is gegroeid.

Resultaten

In de tabel wordt het resultaat weergegeven van de groei, uitgedrukt in entstrepen, van de verschillende *Legionella*-soorten op de BCYE met een oplopende zuurgraad beoordeeld na twee, vier en zes dagen.

Bij stam 2 (*Legionella pneumophila* behorende tot serogroep 2-14) is na vier dagen groei waarneembaar op alle entstrepen over het gehele pH-gebied met uitzondering van pH 6.51 (zie foto). Na zes dagen incubatie wordt op alle entstrepen over het gehele gebied volledi-

ge groei teruggevonden. Stam 1 (*Legionella pneumophila* serogroep 1) groeit langzamer op BCYE met zowel een lage als een hoge zuurgraad. Na vier dagen heeft bij een zuurgraad tussen 6.66 en 6.92 groei plaatsgevonden op alle entstrepen. Na zes dagen wordt op alle entstrepen groei gevonden met uitzondering van pH 6.51 en pH 7.21. Bij deze zuurgraad blijft de groei beperkt tot negen respectievelijk zeven entstrepen. Bij stam 3 (*Legionella non-pneumophila* (WMO)) vindt volledige groei op alle entstrepen plaats op BCYE met een zuurgraad van 6.92. Bij de overige BCYE-platen blijft de groei van stam 3 iets achter *Legionella non-pneumophila* (WMO) met maximaal drie entstrepen minder groei. Bij stam 4 (*Legionella non-pneumophila* (PWN)) blijft de groei achter bij een zuurgraad vanaf 7.05. Na zes dagen incubatie heeft op de BCYE met pH-waarden van 7.13 en 7.21 vrijwel geen groei plaatsgevonden.

Conclusie en aanbeveling

De groei van *Legionella*-bacteriën wordt sterk beïnvloed door de zuurgraad van de voedingsbodem BCYE. Uit het onderzoek blijkt dat de optimale groei op BCYE plaats vindt bij een pH tussen 6.83 en 6.92. Bij BCYE met een pH boven 7.05 kan de groei van *Legionella*-bacteriën worden geremd.

In Nederland wordt het onderzoek naar *Legionella*-bacteriën uitgevoerd volgens NEN 6265. Vele laboratoria die conform deze norm werken, stellen daarbij de zuurgraad van de BCYE bij een temperatuur van 50°C. Na stolling van de BCYE en pH-meting na 24 uur betekent dit in de praktijk een zuurgraad van de BCYE tussen de 7.00 en 7.40. Uit het onder-

zoek is naar voren gekomen dat dergelijke hoge pH-waarden sterk van invloed zijn op de groei van *Legionella*-bacteriën.

Aanbevolen wordt dan ook om binnen afzienbare tijd NEN 6265 aan te passen waarbij duidelijk wordt beschreven dat de zuurgraad van de BCYE moet worden gemeten na stolling van de voedingsbodem. Verder wordt aanbevolen om bij het onderzoek naar *Legionella*-bacteriën volgens NEN 6265 BCYE te gebruiken met een zuurgraad, gemeten bij kamertemperatuur en één dag na bereiding, van 6.90 ± 0.1 . Dit is overeenkomstig met literatuurgegevens betreffende een optimale zuurgraad voor groei van *Legionella*-bacteriën⁽⁶⁾⁽⁷⁾.

Inmiddels is het onderzoek binnen het Nederlands Normalisatie Instituut besproken en is een wijzigingsblad in voorbereiding. 

LITERATUUR

- 1) Tijdelijke regeling *Legionella* preventie in leidingwater, Staatscourant 13 oktober 2000 nr. 199 pag. 8.
- 2) Wijziging en verlenging Tijdelijke regeling *Legionella* preventie in leidingwater Staatscourant 11 oktober 2001 nr. 197 pag. 9.
- 3) NEN 6265 'Bacteriologisch onderzoek van water. Onderzoek naar de aanwezigheid en het aantal kolonievormende eenheden van *Legionella*-bacteriën' (1991). Nederlands Normalisatie Instituut.
- 4) Rob Zwart (2001). Struikelen over *Legionella*. NEN Nieuwsbrief nr. 4.
- 5) Stef Stienstra (2001). Hausse in *Legionella*-analyses. Laboratorium Magazine nr. 6, pag. 33-37.
- 6) Drinking Water Inspectorate Fact Sheet-*Legionella*, Fact sheet nr. 6 Issue nr. 1. (1997).
- 7) <http://gsbs.utmb.edu/microbook/ch40.htm>