

BTO 06.063
15 november 2006

Ontwikkeling van een specifieke kweekmethode voor *L. pneumophila*

BTO 06.063
15 november 2006

Ontwikkeling van een specifieke kweekmethode voor *L. pneumophila*

© 2006 Kiwa N.V.
Alle rechten voorbehouden.
Niets uit deze uitgave mag
worden verveelvoudigd,
opgeslagen in een
geautomatiseerd
gegevensbestand, of
openbaar gemaakt, in enige
vorm of op enige wijze,
hetzij elektronisch,
mechanisch, door
fotokopieën, opnamen, of
enig andere manier, zonder
voorafgaande schriftelijke
toestemming van de
uitgever.

Kiwa N.V.
Water Research
Groningenhaven 7
Postbus 1072
3430 BB Nieuwegein

Tel. 030 606 95 11
Fax 030 606 11 65
www.kiwawaterresearch.eu

Colofon

Titel

Ontwikkeling van een specifieke kweekmethode
voor *L. pneumophila*

Projectnummer

11.1546.100

Projectmanager

Wiel Senden

Opdrachtgever

College van Opdrachtgevers (CVO)

Kwaliteitsborger

Dr. ir. D. van der Kooij

Auteur

H.R. Veenendaal

Dit rapport is verspreid onder BTO-participanten en is openbaar

Samenvatting

Andere *Legionella*-soorten dan *Legionella pneumophila* veroorzaken slechts zeer incidenteel ziektegevallen. Daarom is het wenselijk om op een eenvoudige manier onderscheid te maken tussen *L. pneumophila* en de overige *Legionella*-soorten. In dit rapport is beschreven hoe *Legionella pneumophila* specifiek uit watermonsters kan worden gekweekt.

In de eerste fase van het onderzoek is de invloed onderzocht van hogere pH-waarden van de BCYE-voedingsbodem dan is voorgeschreven in NEN 6265. Het onderzoek is uitgevoerd met geselecteerde teststammen van diverse *Legionella*-soorten. Hoewel bleek dat een aantal *Legionella*-soorten bij de hogere pH-waarden niet meer gekweekt konden worden, konden toch ook nog andere *Legionella*-soorten dan *L. pneumophila* gekweekt worden.

In de tweede fase van het onderzoek is onderzocht wat het effect is van een verhoogde incubatietemperatuur van de voedingsbodems. Dit onderzoek is eveneens uitgevoerd met geselecteerde teststammen van diverse *Legionella*-soorten. Ook deze aanpak bleek niet te leiden tot een specifieke kweekmethode voor *L. pneumophila* hoewel een aantal andere *Legionella*-soorten bij deze temperatuur niet meer konden worden gekweekt.

In de derde fase van het onderzoek is een verhoogde pH-waarde van de voedingsbodem gecombineerd met een verhoogde incubatietemperatuur van de voedingsbodems. Deze combinatie leidde voor de geselecteerde teststammen tot een vrijwel specifieke methode voor de kweek van *L. pneumophila*. Alleen *L. jordanis* en *L. dumoffii* vormden ook kolonies, maar de opbrengst was laag (minder dan 1%).

Vervolgens zijn 30 monsters uit leidingwaterinstallaties onderzocht. Uit dit onderzoek bleek dat de kolonies die gevonden werden met de aangepaste kweekmethode, alle behoorden tot *L. pneumophila*. Monsters waarin geen kolonies werden waargenomen bij toepassing van de aangepaste kweekmethode, bleken geen *L. pneumophila* te bevatten.

Op basis van de verkregen resultaten wordt aanbevolen om voor de bepaling van *Legionella pneumophila* in leidingwater de pH van de BCYE-voedingsbodem te stellen op $\text{pH } 7,35 \pm 0,05$ (bij 25°C) en de incubatietemperatuur te verhogen naar $40 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

Inhoud

	Samenvatting	1
	Inhoud	3
1	Inleiding	5
2	Groei van <i>Legionella</i> op voedings-bodems met verschillende pH-waarden	7
2.1	Doel	7
2.2	Opzet, materialen en methoden	7
2.3	Resultaten en discussie	8
2.4	Conclusies	11
3	Groei van <i>Legionella</i> bij hogere incubatietemperaturen	13
3.1	Doel	13
3.2	Opzet, materiaal en methoden	13
3.3	Resultaten en discussie	13
3.4	Conclusies	15
4	Groei van <i>Legionella</i>-stammen bij een hogere pH van de voedingsbodem en bij een hogere incubatietemperatuur	17
4.1	Doel	17
4.2	Opzet, materialen en methoden	17
4.3	Resultaten	17
4.4	Conclusies	19
5	Toepassing van specifieke kweek-omstandigheden op monsters uit leidingwaterinstallaties	21
5.1	Doel	21
5.2	Opzet, materialen en methoden	21
5.3	Resultaten en discussie	21
5.4	Conclusies	23
6	Discussie	25
7	Conclusies en aanbevelingen	27
7.1	Conclusies	27
7.2	Aanbevelingen	27

1 Inleiding

Na de uitbraak van legionellose in Bovenkarspel (1999) is in 2000 de Tijdelijke Regeling Legionellapreventie verschenen [VROM, 2000]. In deze regeling werd voorgeschreven dat voor alle leidingwaterinstallaties in Nederland een risicoanalyse en een beheersplan dienden te worden opgesteld. Aanbevolen werd om de effecten van de maatregelen te monitoren m.b.v. regelmatige bemonstering en onderzoek op *Legionella*. In 2004 verscheen een aanpassing van het Drinkwaterbesluit [VROM, 2004]. Hierin is voorgeschreven dat, aanvullend op de risicoanalyse en beheersmaatregelen, elke installatie die onder deze wettelijke regeling valt, periodiek moet worden bemonsterd om aan te tonen dat *Legionella* afwezig is (<100 kve/l).

Voor monsterneming en analyse van *Legionella* geldt de Nederlandse Norm NEN 6265 [NEN, 1991]. In deze norm wordt een semi-selectieve voedingsbodem voorgeschreven. De pH van deze voedingsbodem wordt gesteld op $\text{pH } 6,9 \pm 0,05$, gemeten bij 50°C. Uit onderzoek is gebleken dat voedingsbodems waarvan de pH was gesteld op $\text{pH } 6,9 \pm 0,1$ bij 25°C meer monsters met *Legionella* opleverden [In't Veld en De Wagt, 2002]. Deze waarneming heeft geresulteerd in een wijzigingsblad bij NEN 6265 [NEN, 2003]. Ook na deze aanpassing werd nog geconcludeerd dat het onderzoek naar *Legionella* na 21 jaar nog niet uitontwikkeld is [Van der Kooij et al., 2003].

In een onderzoek in 2003 werd *Legionella* aangetroffen in 16 van 400 onderzochte woninginstallaties. In alle gevallen bleek het te gaan om *L. anisa*. Uit de wetenschappelijke literatuur bleek dat *L. anisa* slechts zeer incidenteel infecties bij de mens veroorzaakt. Bovendien is *L. anisa* in Nederland nooit als ziekteverwekker aangetroffen [Oesterholt en Van der Kooij, 2003]. Ook andere *Legionella*-soorten dan *L. pneumophila* (de zogenaamde non-pneumophila-soorten) worden slechts incidenteel bij mensen aangetroffen [Gezondheidsraad, 2003]

Inmiddels blijkt dat een substantieel deel van de onderzochte leidingwatermonsters andere *Legionella*-soorten bevat dan *L. pneumophila* waaronder niet-kweekbare soorten die nog niet beschreven zijn [Wullings en Van der Kooij, 2006]. In het Waterleidingbesluit is voorgeschreven dat corrigerende acties moeten plaatsvinden als met de genoemde kweekmethode *Legionella* in leidinginstallaties wordt aangetroffen. Hierbij wordt geen onderscheid gemaakt tussen ziekteverwekkende soorten (voornamelijk *L. pneumophila*) en soorten die slechts zeer incidenteel bij mensen ziekte veroorzaken (zoals de in Nederland veel voorkomende *L. anisa*). Dit kan leiden tot beheersmaatregelen die uit oogpunt van volksgezondheid wellicht niet noodzakelijk zijn.

In dit rapport is de ontwikkeling beschreven van een kweekmethode die alleen *L. pneumophila* aantoonst. Onderzocht is of met een andere pH van de BCYE-voedingsbodem of met een andere incubatietemperatuur onderscheid gemaakt kan worden tussen *L. pneumophila* en andere *Legionella*-soorten.

2 Groei van *Legionella* op voedingsbodems met verschillende pH-waarden

2.1 Doel

Doel van de eerste fase van het onderzoek is om vast te stellen bij welke pH-waarden diverse *Legionella*-soorten kunnen groeien op de BCYE-voedingsbodem. Daarnaast moet worden vastgesteld bij welke pH-waarden van deze voedingsbodem de groei nog gelijkwaardig is aan de groei bij de nu voorgeschreven pH (pH $6,9 \pm 0,1$).

2.2 Opzet, materialen en methoden

Er zijn twee experimenten uitgevoerd. Het eerste experiment diende om te onderzoeken in welke pH-range de geselecteerde *Legionella*-stammen kunnen groeien. Het tweede experiment werd uitgevoerd om de kritische pH-waarde nauwkeurig te kunnen vaststellen.

Voedingsbodems werden gemaakt volgens NEN 6265, maar de pH werd in het eerste experiment gesteld op 6,09; 6,29; 6,50; 6,79; 6,91; 7,03; 7,27; 7,62; 7,80 en 7,92. Deze pH-waarden werden gesteld door meer of minder KOH toe te voegen dan in NEN 6265 is voorgeschreven. De pH-waarden in het tweede experiment werden gesteld op 6,92; 7,21; 7,34; 7,42 en 7,51 (gemeten bij 25°C). De maximale afwijking van de pH-meting bedroeg 0,05. Aan de voedingsbodems werden geen antibiotica toegevoegd.

De *Legionella*-soorten waarmee de opbrengst op deze voedingsbodems is bepaald, zijn *Legionella pneumophila* serogroep 1 (eigen isolaat, afkomstig uit een leidinginstallatie), *Legionella pneumophila* serogroep 3 (ATCC33155), *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 werden maximaal drie dagen opgekweekt bij 37°C op de standaard BCYE-voedingsbodem zonder antibiotica (pH $6,9 \pm 0,1$). Vervolgens werden suspensies gemaakt waarvan verschillende verdunningen in veelvoud werden ingevroren bij -80°C. Na invriezen is bepaald in welke verdunningen na uitspatelen 50 tot 300 kolonievormende eenheden (kve) aanwezig waren op het BCYE-voedingsbodem. Beide experimenten werden met suspensies uit deze batch uitgevoerd.

Voor het vergelijkend onderzoek werden de voedingsbodems steeds in viervoud beënt met 0,1 ml van deze diepvriessuspensie. Na incubatie gedurende 7 dagen bij $37 \pm 1^\circ\text{C}$ werden op alle voedingsbodems de kolonies geteld.

De hoogste opbrengst op de voedingsbodems is steeds op 100% gesteld. De lagere opbrengsten op de voedingsbodems zijn berekend als percentages van de hoogste opbrengst.

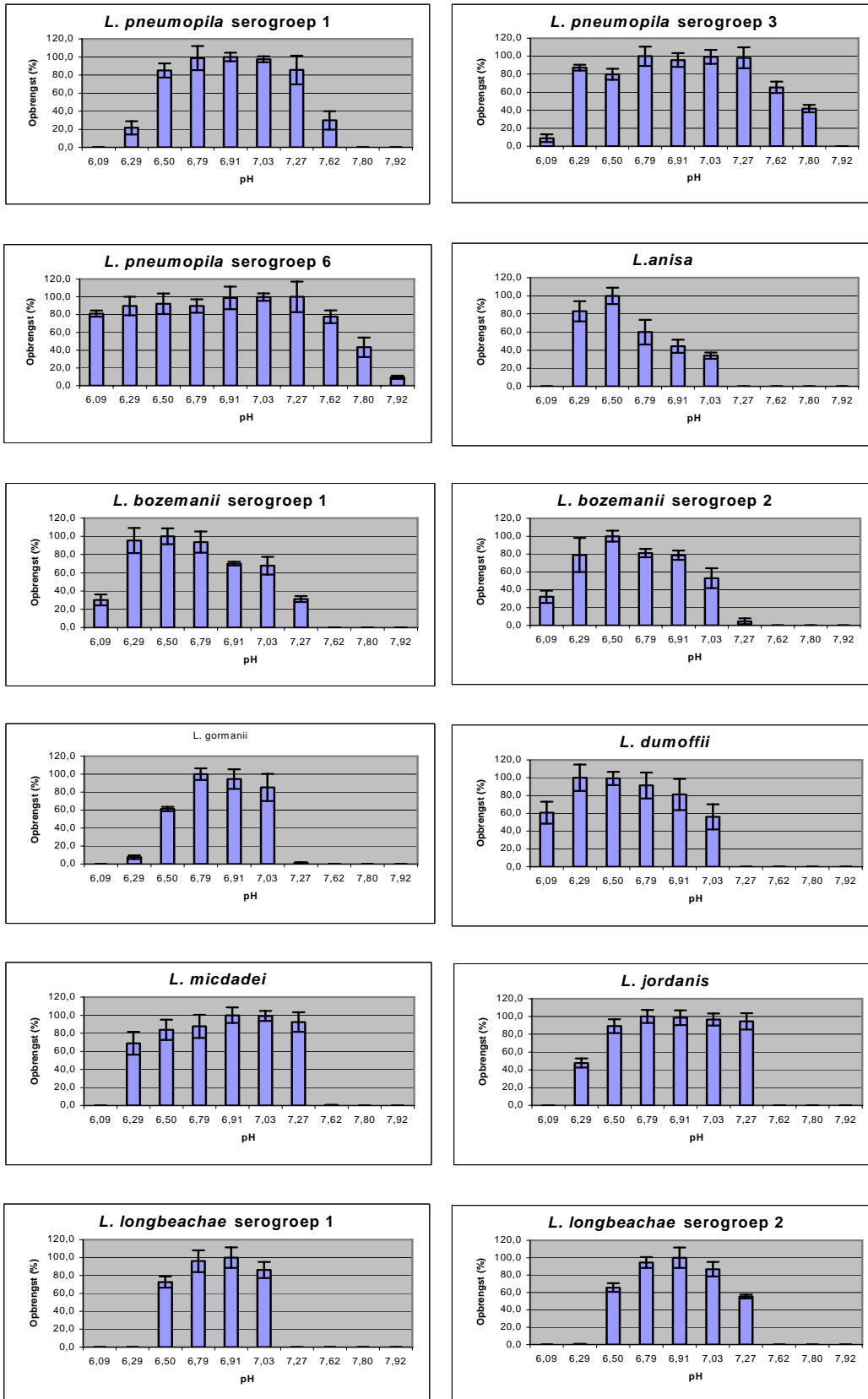
2.3 Resultaten en discussie

In figuur 1 zijn de resultaten weergegeven van de opbrengst op de verschillende voedingsbodems van het eerste experiment.

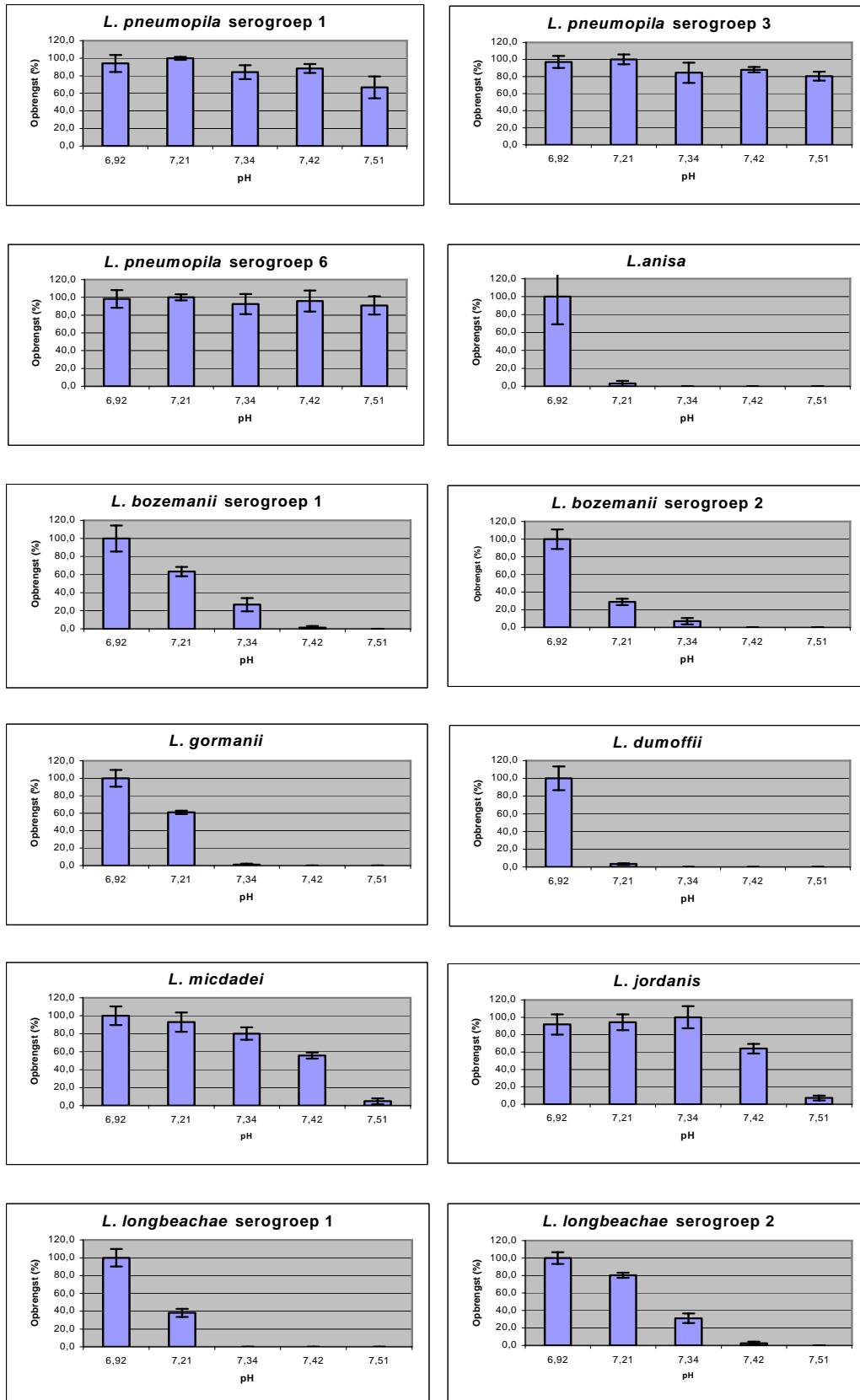
Uit de resultaten blijkt dat voor de meeste onderzochte *Legionella*-stammen het groei-optimum ligt op BCYE-voedingsbodems met een pH tussen pH 6,79 en pH 7,03 ligt. Het groei-optimum voor beide stammen van *L. bozemanii*, voor *L. dumoffii* en *L. anisa* ligt op de voedingsbodems met pH 6,50 of lager. *L. pneumophila* groeit op voedingsbodems met een pH in een brede pH-range waarbij de opbrengst niet significant (t-toets, tweezijdig getoetst met 95% betrouwbaarheid) [Baggelaar, 1997]) verschilt van de opbrengst bij de optimum-pH. De opbrengst van *L. pneumophila* is op voedingsbodems met pH 7,27 niet significant lager dan bij de opbrengst op voedingsbodems met de optimum pH (tussen pH 6,79 en pH 7,03). *L. gormanii*, *L. longbeachae* en *L. anisa* kennen daarentegen slechts weinig pH-tolerantie van de voedingsbodems.

De opbrengst op de BCYE-voedingsbodem met de in NEN 6265 voorgeschreven pH $6,90 \pm 0,1$ ligt voor *L. bozemanii* serogroep 1 (25%), *L. bozemanii* serogroep 2 (50%) en *L. anisa* (50%) significant lager dan de opbrengst op de voedingsbodem met de voor deze stammen optimale pH (pH 6,50).

In het tweede experiment werd de groei op BCYE-voedingsbodems met een pH tussen pH 6,92 en pH 7,51 onderzocht. In figuur 2 zijn de gemiddelden en standaardafwijking van de resultaten weergegeven van de opbrengst op de verschillende voedingsbodems.



Figuur 1: De relatieve opbrengst van enkele Legionella-stammen op BCYE-voedingsbodems met verschillende pH-waarden in het gehele pH-gebied.



Figuur 2: De relatieve opbrengst van enkele Legionella-stammen op BCYE-voedingsbodems met verschillende pH in het onderscheidende pH-gebied.

Met behulp van de t-toets is nagegaan of er een significant verschil is tussen de hoogste opbrengst en de opbrengst op de BCYE-voedingsbodems met een andere pH. Hierbij is tweezijdig getoetst met 95% betrouwbaarheid (Tabel 1).

Tabel 1: Invloed van de pH van de voedingsbodems op de groei van geselecteerde *Legionella*-soorten; 0, niet significant lager dan de maximum opbrengst; -, significant lager dan de maximum opbrengst (t-toets, tweezijdig getoetst met 95% betrouwbaarheid)

Legionella-stam	pH van maximale groei	pH			
		7,21	7,34	7,42	7,51
<i>L. pneumophila</i> serogroep 1	6,91	0	0	0	-
<i>L. pneumophila</i> serogroep 3	6,79	0	0	0	-
<i>L. pneumophila</i> serogroep 6	7,03	0	0	0	0
<i>L. bozemanii</i> serogroep 1	6,50	-	-	-	-
<i>L. bozemanii</i> serogroep 2	6,50	-	-	-	-
<i>L. longbeachae</i> serogroep 1	6,91	-	-	-	-
<i>L. longbeachae</i> serogroep 2	6,91	-	-	-	-
<i>L. gormanii</i>	6,79	-	-	-	-
<i>L. dumoffii</i>	6,29	-	-	-	-
<i>L. micdadei</i>	6,91	0	-	-	-
<i>L. jordanis</i>	6,79	0	0	-	-
<i>L. anisa</i>	6,50	-	-	-	-

De groei van *L. pneumophila* op BCYE-voedingsbodems met pH 7,42 was niet significant lager dan de groei op BCYE-voedingsbodems met pH $6,9 \pm 0,1$. Ook op BCYE-voedingsbodems met pH 7,42 en met pH 7,51 groeiden *Legionella*-soorten die niet behoren tot *L. pneumophila*.

L. bozemanii, *L. longbeachae*, *L. gormanii*, *L. micdadei* en *L. anisa* geven op BCYE-voedingsbodems met pH 7,21 een significant lagere opbrengst dan op BCYE-voedingsbodems met de optimum-pH voor deze stammen.

De pH van voedingsbodems laat zich moeilijk binnen grenzen van $\pm 0,01$ stellen. Een range van $\pm 0,05$ is het maximaal haalbare. Indien gekozen zal worden voor voedingsbodems met pH $7,42 \pm 0,05$, dan zou bij pH van 7,47 mogelijk remming van *L. pneumophila* kunnen optreden. Daarom kan veiligheidshalve beter gekozen worden voor een pH van $7,35 \pm 0,05$. Op voedingsbodems met deze pH zal *L. pneumophila* niet geremd worden maar zal mogelijk ook geen remming van *L. jordanis* en *L. micdadei* plaatsvinden.

2.4 Conclusies

Uit de resultaten blijkt dat de pH van de BCYE-voedingsbodem invloed heeft op de groei van *Legionella*-stammen. De pH van BCYE-voedingsbodems voor *L. pneumophila* waarop de maximum groei plaatsvindt ligt tussen 6,79 en 7,03. Deze pH-range komt overeen met de pH zoals voorgeschreven in NEN 6265 (pH $6,9 \pm 0,1$).

Bij pH 7,21 van de voedingsbodem kan onderscheid gemaakt worden tussen *L. pneumophila* en *L. bozemanii*, *L. longbeachae*, *L. gormanii*, *L. dumoffii* en *L. anisa* maar onvoldoende met *L. micdadei* en *L. jordanis*. Op BCYE-voedingsbodems met pH 7,42 is de groei van alle geteste *Legionella*-soorten significant minder dan op BCYE-voedingsbodems met het pH-optimum voor deze soorten. De

opbrengst van *L. pneumophila* is bij pH 7,42 niet significant lager dan bij het pH-optimum van deze stammen.
Omdat ook bij een hogere pH van de voedingsbodem naast *L. pneumophila* ook nog andere *Legionella*-soorten blijken te kunnen groeien, is alleen pH-verhoging van de voedingsbodem niet voldoende om onderscheid te maken tussen *L. pneumophila* en andere *Legionella*-soorten.

3 Groei van *Legionella* bij hogere incubatietemperaturen

3.1 Doel

Het doel van de tweede fase van het onderzoek is na te gaan of op basis van de incubatietemperatuur van de voedingsbodem onderscheid gemaakt kan worden tussen *L. pneumophila* en andere *Legionella*-soorten.

3.2 Opzet, materiaal en methoden

Voor dit onderzoek werden BCYE-voedingsbodems gebruikt conform NEN 6265. De pH van deze voedingsbodems bedroeg 6,90. De stammen en suspensies die gebruikt werden zijn beschreven in paragraaf 2.2.

L. longbeachae serogroep 1 is bij dit experiment niet meegenomen omdat bleek dat de suspensie verontreinigd was.

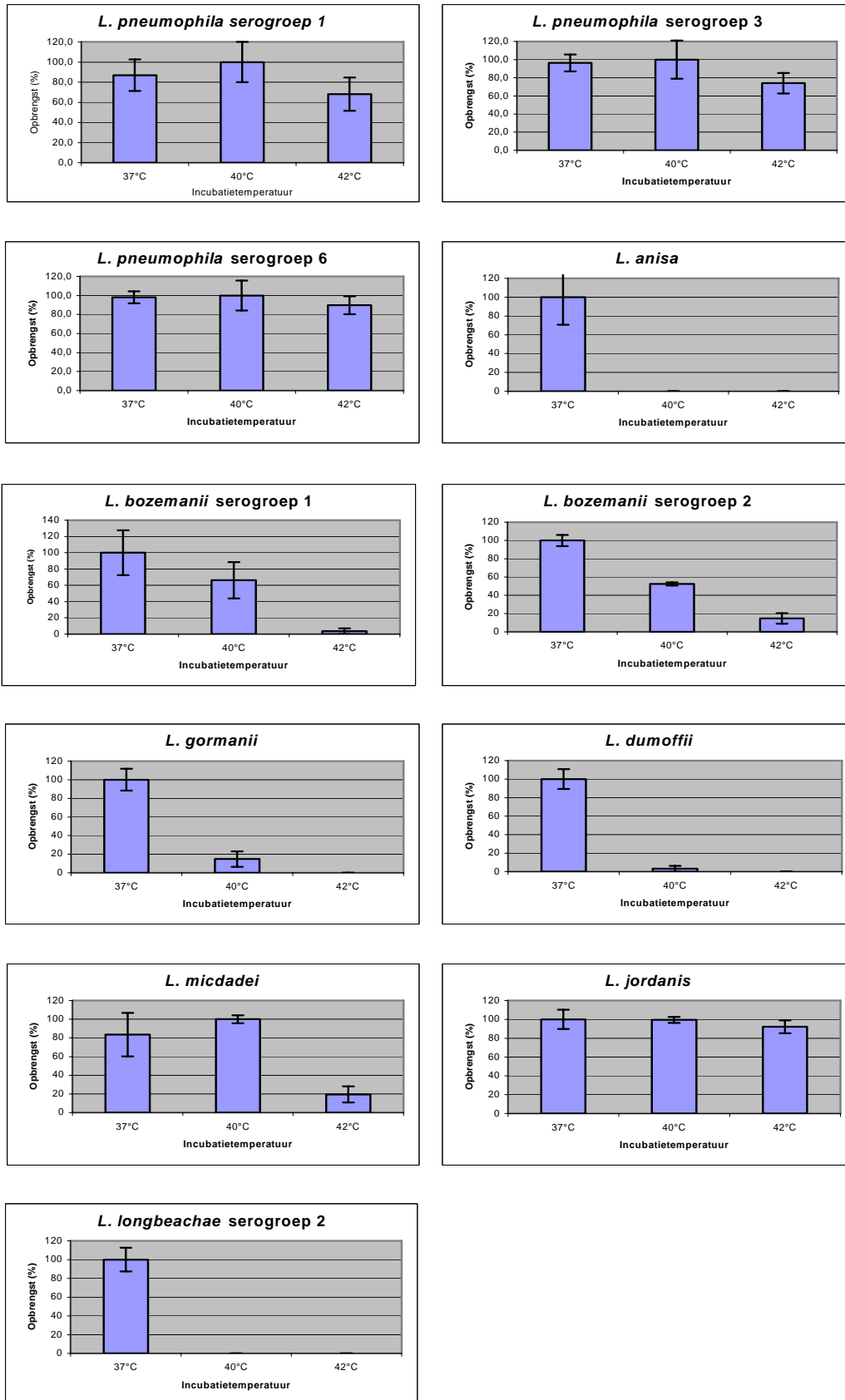
Voor het onderzoek werden de voedingsbodems steeds in drievoud beënt met 0,1 ml van deze diepvriessuspensie. Na incubatie gedurende 7 dagen bij $37 \pm 1^\circ\text{C}$; $40 \pm 0,5^\circ\text{C}$ en bij $42 \pm 0,5^\circ\text{C}$ werden op alle voedingsbodems de kolonies geteld.

De hoogste opbrengst op de voedingsbodems is steeds op 100% gesteld. De lagere opbrengsten op de voedingsbodems zijn berekend als percentages van de hoogste opbrengst.

3.3 Resultaten en discussie

In figuur 3 zijn de gemiddelden en standaardafwijking van de resultaten weergegeven van de groei bij verschillende temperaturen.

L. longbeachae serogroep 2 en *L. anisa* bleken niet te groeien bij 40°C . *L. gormanii*, en *L. dumoffii* groeiden niet meer bij 42°C .



Figuur 3: De relatieve opbrengst van verschillende Legionella-stammen na incubatie bij 37, 40 en 42°C

Met behulp van de t-toets is berekend of een significant verschil kan worden aangetoond tussen de opbrengst bij 37°C en de opbrengst op de voedingsbodems die geïncubeerd werden bij 40 en bij 42°C. Hierbij is tweezijdig getoetst met 95% betrouwbaarheid. (tabel 2).

Tabel 2: Invloed van de incubatietemperatuur op de opbrengst van geselecteerde *Legionella*-stammen. 0, niet significant lager dan de maximum opbrengst bij 37°C en -, significant lager dan de maximum opbrengst bij 37°C. (t-toets, tweezijdig getoetst met 95% betrouwbaarheid)

<i>Legionella</i> -stam	40 °C	42 °C
<i>L. pneumophila</i> serogroep 1	0	0
<i>L. pneumophila</i> serogroep 3	0	-
<i>L. pneumophila</i> serogroep 6	0	0
<i>L. bozemanii</i> serogroep 1	0	-
<i>L. bozemanii</i> serogroep 2	-	-
<i>L. longbeachae</i> serogroep 2	-	-
<i>L. gormanii</i>	-	-
<i>L. dumoffii</i>	-	-
<i>L. micdadei</i>	0	-
<i>L. jordanis</i>	0	0
<i>L. anisa</i>	-	-

De opbrengst van *L. pneumophila*, *L. bozemanii* serogroep 1, *L. micdadei* en *L. jordanis* bleek bij incubatie bij 40°C niet significant lager dan bij 37°C. De opbrengst van *L. pneumophila* serogroep 1, *L. pneumophila* serogroep 6 en *L. jordanis* is bij 42°C significant niet lager dan bij 37°C

3.4 Conclusies

Op basis van een hogere incubatietemperatuur (40°C) kan onderscheid gemaakt worden tussen *L. pneumophila* en *L. bozemanii* serogroep 2, *L. longbeachae* serogroep 2, *L. gormanii*, *L. dumoffii* en *L. anisa* maar niet met *L. bozemanii* serogroep 1, *L. micdadei* en *L. jordanis*.

Omdat ook bij een incubatietemperatuur van 42°C *L. pneumophila* serogroep 3 geen groei meer laat zien terwijl *L. jordanis* bij deze temperatuur nog wel groeit, kan op basis van alleen incubatietemperatuur geen onderscheid gemaakt worden tussen *L. pneumophila* en andere *Legionella*-stammen.

4 Groei van *Legionella*-stammen bij een hogere pH van de voedingsbodem en bij een hogere incubatietemperatuur

4.1 Doel

Uit beide vorige experimenten bleek dat bij een hogere pH van de voedingsbodem dan is voorgeschreven in NEN 6265, enkele *Legionella*-soorten in hun groei geremd worden. Eveneens bleek dat een hogere incubatietemperatuur onderscheid kan maken tussen diverse *Legionella*-soorten. Met geen van beide methodes apart kan echter volledig onderscheid gemaakt worden tussen *L. pneumophila* en de andere *Legionella*-soorten. Daarom is onderzocht of een hogere pH van de voedingsbodem gecombineerd met incubatie bij een hogere temperatuur, wel onderscheid laat zien tussen *L. pneumophila* en de overige *Legionella*-soorten.

4.2 Opzet, materialen en methoden

In dit experiment werden dezelfde suspensies gebruikt als bij de voorgaande experimenten. De bereiding is beschreven in paragraaf 2.2. *L. longbeachae* serogroep 1 is bij dit experiment niet meegenomen omdat bleek dat de suspensie verontreinigd was.

BCYE-voedingsbodems werden bereid met pH $6,9 \pm 0,1$ (conform NEN 6265) en met pH $7,35 \pm 0,05$ (zie hoofdstuk 2). Voor het onderzoek zijn de voedingsbodems steeds in drievoud beënt met 0,1 ml van deze diepvriessuspensie. Na incubatie gedurende 7 dagen bij $37 \pm 1^\circ\text{C}$, $40 \pm 0,5^\circ\text{C}$ en bij $42 \pm 0,5^\circ\text{C}$ werden op alle voedingsbodems de kolonies geteld.

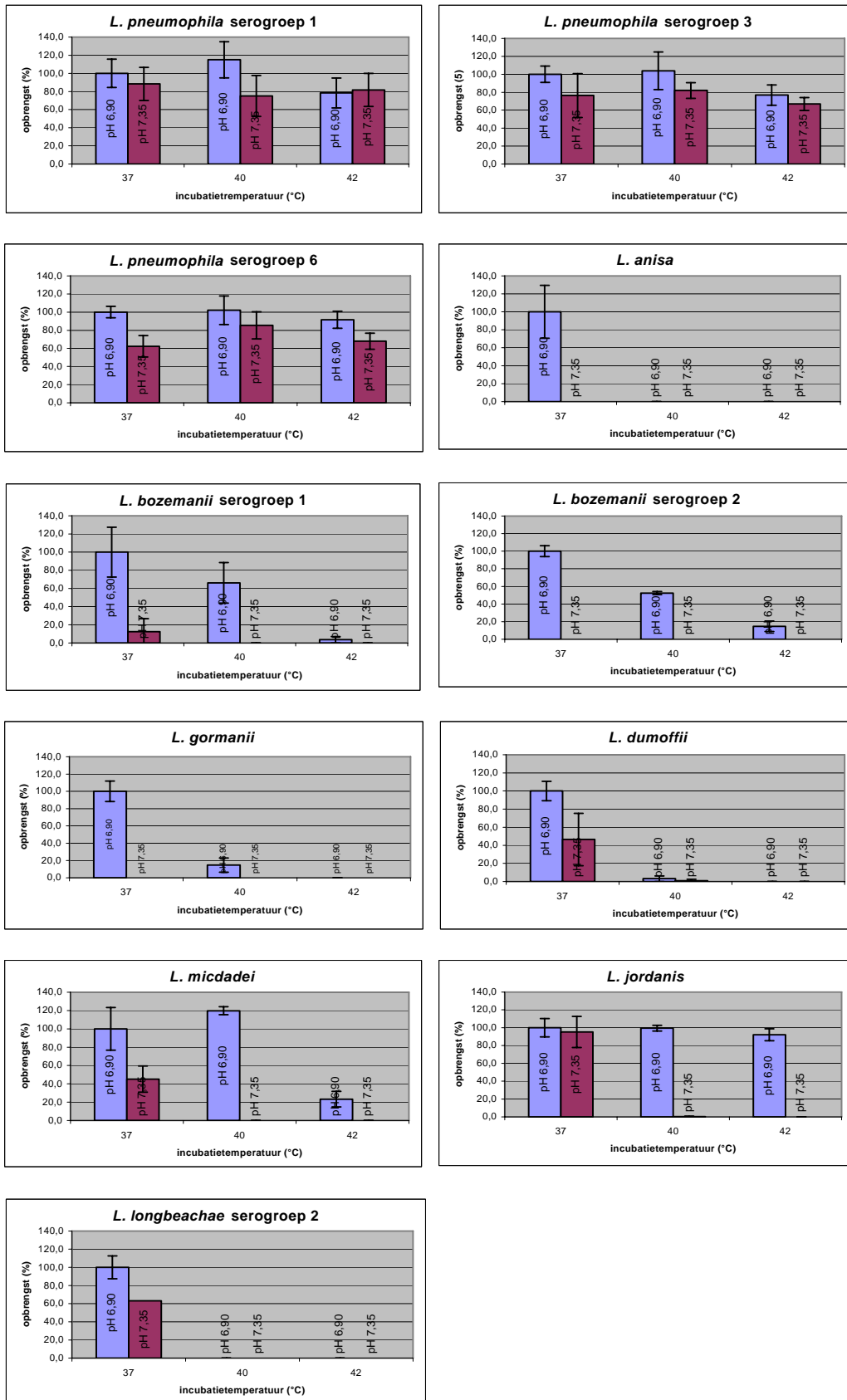
De hoogste opbrengst op de voedingsbodems is steeds op 100% gesteld. De lagere opbrengsten op de voedingsbodems zijn berekend als percentages van de hoogste opbrengst.

4.3 Resultaten

In figuur 4 zijn de resultaten weergegeven van de opbrengst op de beide voedingsbodems met pH 6,90 en pH 7,35 en geïncubeerd bij 37, 40 en bij 42°C.

Met behulp van de t-toets kan voor *L. pneumophila* geen significant verschil worden aangetoond tussen de opbrengst bij incubatie bij 37, 40 en 42°C op de voedingsbodem met pH 6,90 en eveneens niet tussen de opbrengst op de BCYE-voedingsbodems met pH 7,35, die geïncubeerd werden bij 37, 40 en bij 42°C. Hierbij is tweezijdig getoetst met 95% betrouwbaarheid.

Uit de resultaten blijkt dat de opbrengst van *L. pneumophila* op BCYE-voedingsbodems met pH 7,35 en geïncubeerd bij 40°C, niet significant lager is dan bij de in NEN 6265 voorgeschreven condities (op BCYE-voedingsbodems met pH $6,9 \pm 0,1$ en geïncubeerd bij $37 \pm 1^\circ\text{C}$). De overige *Legionella*-stammen gaven geen of zeer weinig groei te zien onder deze kweekcondities. De opbrengst van *L. dumoffii* en *L. jordanis* was minder dan 1%.



Figuur 4: De relatieve opbrengst op voedingsbodems met j pH 6,90 en pH 7,35 en geïncubeerd bij 37, 40 en 42°C.

4.4 Conclusies

Bij incubatie bij $40 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ op BCYE-voedingsbodem met $\text{pH } 7,35 \pm 0,05$ vindt geen significante remming plaats van de groei van *L. pneumophila*. Onder deze kweekomstandigheden blijft groei van de onderzochte andere *Legionella*-stammen vrijwel volledig achterwege. Op basis hiervan kan geconcludeerd worden dat deze kweekomstandigheden selectief zijn voor *L. pneumophila*.

5 Toepassing van specifieke kweekomstandigheden op monsters uit leidingwaterinstallaties

5.1 Doel

Doel van deze fase in het onderzoek is het testen van de aangepaste kweekomstandigheden zoals beschreven in hoofdstuk 4, op watermonsters afkomstig uit diverse leidingwaterinstallaties.

5.2 Opzet, materialen en methoden

Voor het onderzoek werden BCYE-voedingsbodems (met en zonder antibiotica) bereid conform NEN 6265. De pH werd zoals voorgeschreven gesteld op $\text{pH } 6,90 \pm 0,1$. Daarnaast zijn BCYE-voedingsbodems bereid waarvan de pH op $\text{pH } 7,35 \pm 0,05$ gesteld werd.

In totaal werden 30 leidingwatermonsters gefiltreerd (volgens NEN 6265). Deze filtraten zijn gedurende 1 week bij 0-4°C bewaard. Daarna werd 0,1 ml op de BCYE-voedingsbodems uitgestreken en geïncubeerd bij 37 en 42 °C. Een deel van de monsters werd in enkelvoud uitgespateld, een ander deel in tweevoud. Na 7 dagen zijn de verdachte kolonies geteld en bevestigd door parallele overenting op BCYE-voedingsbodems met en zonder cysteïne. Kolonies werden m.b.v. antisera van Oxoid (artikelnr. DR800) nader gedetermineerd waarbij onderscheid gemaakt kon worden tussen *L.pneumophila* (serogroep 1 tot 14) en stammen die geen *L. pneumophila* serogroep 1-14 waren.

5.3 Resultaten en discussie

Tien van de 30 monsters lieten groei zien op de BCYE-voedingsbodems met pH 7,35 en geïncubeerd bij 37°C (tabel 3). Op de BCYE-voedingsbodems zonder cysteïne werden geen *Legionella*-verdachte kolonies aangetroffen. Twaalf van de 30 monsters die geïncubeerd werden bij 40°C vertoonden groei op de BCYE-voedingsbodems met pH 7,35. Dit waren dezelfde monsters als die bij 37°C op het BCYE-voedingsbodem met pH 7,35 groeiden. Bij twee monsters, waarvan na incubatie bij 37°C de voedingsbodems niet beoordeeld konden worden door de storende achtergrondflora, werd op de voedingsbodems die bij 40°C geïncubeerd werden wel *Legionella* aangetroffen.

BCYE-voedingsbodems bij pH 6,90 met antibiotica, gaven een hogere opbrengst dan de BCYE-voedingsbodems zonder antibiotica die eveneens geïncubeerd werden bij 37°C. Een deel hiervan werd veroorzaakt door remming door bijgroei van andere micro-organismen dan *Legionella*. De resultaten van de platen met de hoogste opbrengst zijn weergegeven in tabel 3. De aantallen typische kolonies op de voedingsbodems die geïncubeerd werden bij 40°C weken niet af van de aantallen van de typische kolonies op de voedingsbodems met pH 6,90 en geïncubeerd bij 37°C.

Serotypering wees uit dat 12 van de *Legionella*-stammen behoorden tot *L. pneumophila* (serogroep 1-14). Deze stammen waren afkomstig van de monsters die groei vertoonden op de voedingsbodems met pH 7,35 die bij 40°C geïncubeerd waren. De overige 18 geïsoleerde stammen werden getypeerd als non-pneumophila soorten. 15 stammen behoorden tot *L. dumoffii*, *L. longbeachae* serogroep 1, *L. longbeachae* serogroep 2, *L. anisa*, *L. bozemanii* serogroep 1, *L. bozemanii* serogroep 2, *L. jordanis*, *L. micdadei* en *L. gormanii*. De overige 3 stammen behoorden niet tot een van deze *Legionella*-soorten.

Tabel 3: Koloniegetallen van *Legionella*-bacteriën in leidingwatermonsters geïncubeerd bij 37 en 40°C op BCYE-voedingsbodems met pH 6,90 en 7,35. ntb; niet te beoordelen door storende achtergrondgroei, nd; niet uitgevoerd; sg; serogroep, non-pneumophila; *Legionella*-soorten niet behorend tot *L. pneumophila*.

monster	37°C		40°C		serotypering
	pH6,90	pH 7,35	pH 6,90	pH 7,35	
1	850	<50	<50	<50	non-pneumophila
2	200	<50	<50	<50	non-pneumophila
3	600	800	950	500	<i>L. pneumophila</i> sg 2-14
4	600	850	600	750	<i>L. pneumophila</i> sg 2-14
5	400	<50	<50	<50	non-pneumophila
6	1.700	<50	<50	<50	non-pneumophila
7	6.400	<50	<50	<50	non-pneumophila
8	1.550	<50	<50	<50	non-pneumophila
9	3.450	<50	<50	<50	non-pneumophila
10	1.850	<50	<50	<50	non-pneumophila
11	>15.000	<50	<50	<50	non-pneumophila*)
12	650	<50	<50	<50	non-pneumophila
13	1.650	<50	<50	<50	non-pneumophila
14	1.100	<50	<50	<50	non-pneumophila
15	>15.000	<50	<50	<50	non-pneumophila*)
16	100	200	100	200	<i>L. pneumophila</i> sg 1
17	100	300	250	250	<i>L. pneumophila</i> sg 1
18	150	100	50	50	<i>L. pneumophila</i> sg 1
19	450	<50	<50	<50	non-pneumophila
20	200	<50	<50	<50	non-pneumophila
21	100	150	100	100	<i>L. pneumophila</i> sg 2-14
22	ntb	ntb	6.750	2.850	<i>L. pneumophila</i> sg 2-14
23	650	450	500	650	<i>L. pneumophila</i> sg 2-14
23	4.300	<50	<50	<50	non-pneumophila*)
25	ntb	ntb	150	100	<i>L. pneumophila</i> sg 1
26	ntb	100	150	150	<i>L. pneumophila</i> sg 1
27	450	400	400	250	<i>L. pneumophila</i> sg 1
28	1.600	<50	<50	<50	non-pneumophila
29	1.450	<50	<50	<50	non-pneumophila
30	1.000	700	nd	1.450	<i>L. pneumophila</i> sg 1

*) niet behorend tot *L. dumoffii*, *L. longbeachae* serogroep 1, *L. longbeachae* serogroep 2, *L. anisa*, *L. bozemanii* serogroep 1, *L. bozemanii* serogroep 2, *L. jordanis*, *L. micdadei* en *L. gormanii*.

De opbrengst op de voedingsbodems met pH 6,90 en pH 7,35 die geïncubeerd werden bij 40°C laten bij deze monsters overeenkomstige resultaten zien. Eerder was echter gebleken dat dat niet voor alle *Legionella*-soorten geldt (hoofdstuk 4). Uit de resultaten van deze leidingwatermonsters kan dus niet geconcludeerd worden dat incubatie bij 40°C op voedingsbodems met pH 6,90 altijd alleen *L. pneumophila* zal opleveren.

5.4 Conclusies

Uit de resultaten blijkt dat op BCYE-voedingsbodems met pH 7,35 selectief *L. pneumophila* werd geïsoleerd uit watermonsters. BCYE met pH 7,35 liet geen groei zien van *Legionella*-soorten anders dan *L. pneumophila*. De opbrengst op voedingsbodems met pH 7,35, geïncubeerd zowel bij 37 als bij 40°C, wijkt voor *L. pneumophila* niet af van de opbrengst op voedingsbodems met pH 6,90 en geïncubeerd bij 37°C. Een incubatietemperatuur van 40°C lijkt bij deze watermonsters geen extra waarde te hebben dan dat storende achtergrondflora geremd kan worden. Gezien de eerdere resultaten kan echter niet worden uitgesloten dat deze temperatuur voor andere *Legionella*-soorten dan in deze monsters voorkwamen wel van remmende invloed is, waardoor incubatie bij 40°C toch zal moeten worden toegepast.

6 Discussie

De meeste onderzochte *Legionella*-soorten blijken bij de pH van de voedingsbodem die is voorgeschreven is in NEN 6265 optimaal te kunnen groeien. Dit is in overeenstemming met eerdere waarnemingen (In 't Veld en De Wagt, 2002). Bij deze pH groeit behalve *L. pneumophila* ook de relatief veel voorkomende maar weinig ziekteverwekkende *L. anisa*. Door het verhogen van de pH van de voedingsbodem naar pH 7,35, maar ook door het verhogen van de kweektemperatuur naar 40°C, wordt *L. anisa* echter volledig in de groei geremd. Andere onderzochte *Legionella*-soorten bleken nog wel in staat om bij een van deze kweekomstandigheden te groeien.

Als zowel de pH van de voedingsbodem als de incubatietemperatuur verhoogd worden, blijkt *L. pneumophila* in staat te groeien terwijl de overige geteste *Legionella*-stammen daar niet meer toe in staat zijn.

Uit het onderzoek is gebleken dat voedingsbodems met pH 7,42 volledig onderscheid kunnen maken tussen *L. pneumophila* en de andere onderzochte *Legionella*-soorten, maar dat een pH van 7,51 wel remming geeft van *L. pneumophila* serogroep 6. Een pH van 7,42 is echter niet altijd precies te bereiken; enige tolerantie moet zijn toegestaan. Een tolerantie van 0,05 pH-eenheden is haalbaar. Omdat de pH maximaal 7,42 mag bedragen is gekozen voor een voedingsbodem met pH $7,35 \pm 0,05$. Nadeel van deze pH-range is dat *L. jordanis* en mogelijk ook *L. micdadei* wel in staat kunnen zijn zich te vermeerderen.

Hoewel in dit onderzoek de meest-voorkomende *Legionella*-species (8 van de ca. 50) zijn onderzocht, valt het niet uit te sluiten dat er meer *Legionella*-soorten zijn die bij de beschreven specifieke kweekomstandigheden kunnen groeien. Dit zal nog verder onderzocht moeten worden. Nadere typering van alle geïsoleerde stammen blijft altijd noodzakelijk om vast te stellen of het om *L. pneumophila* gaat of om een andere *Legionella*-soort.

Gebleken is dat 3 van de 5 non-pneumophila stammen die wel bij pH 7,35 konden groeien niet konden groeien op deze BCYE-voedingsbodems mits geïncubeerd bij 40°C. Van *L. dumoffii* en *L. jordanis* werd dan nog minder dan 1% teruggevonden.

Verhoging van de incubatietemperatuur tot 40°C leverde bij 30 watermonsters geen andere resultaten op dan met de voedingsbodems met pH 7,35 die geïncubeerd werden bij 37°C. De opbrengst (kve/l) was onder beide condities vergelijkbaar. Drie van de non-pneumophilasoorten die werden waargenomen bij 37°C behoorden serologisch niet tot de soorten waarvan referentiestammen onderzocht waren. Dit laat zien dat bij de gekozen kweekomstandigheden (pH 7,35; 40°C) waarschijnlijk ook niet onderzochte *Legionella*-soorten niet meer in staat zijn te groeien. Een isolatietemperatuur tot 40°C bleek in een aantal monsters de storende achtergrondflora te remmen.

7 Conclusies en aanbevelingen

7.1 Conclusies

- *L. anisa* bleek zich op voedingsbodems met een pH gelijk of hoger dan 7,27 zich niet meer te kunnen vermeerderen, maar verhoging of verlaging van alleen de pH van de voedingsbodem levert onvoldoende selectiviteit om *L. pneumophila* te kunnen onderscheiden van non-pneumophila-soorten.
- Verhoging van de incubatietemperatuur van de voedingsbodems levert onvoldoende selectiviteit om *L. pneumophila* te kunnen onderscheiden van non-pneumophila-soorten. *L. jordanis*, *L. bozemanii* serogroep 2, *L. dumoffii* en *L. micdadei* blijken ook bij 40°C in meer of mindere mate te kunnen groeien, terwijl *L. anisa* daartoe niet in staat blijkt.
- Gelijktijdige verhoging van de pH van de voedingsbodem tot pH 7,35 en incubatie bij 40°C is selectief voor *L. pneumophila*. Geen van de onderzochte overige *Legionella*-soorten groeit onder deze omstandigheden.
- Verhoging van de pH van de BCYE-voedingsbodems tot 7,35 leverde bij isolatie van 30 onderzochte watermonsters alleen *L. pneumophila* op, waarbij de opbrengst vergelijkbaar was aan de opbrengst op voedingsbodems met pH 6,90 en geïncubeerd bij 37°C (conform NEN 6265).
- Een isolatietemperatuur tot $40 \pm 0,5^\circ\text{C}$ bleek storende achtergrondflora te remmen.

7.2 Aanbevelingen

- Bij onderzoek naar *Legionella pneumophila* in water moet de pH van de BCYE-voedingsbodem gesteld worden op $\text{pH } 7,35 \pm 0,05$ (bij 25°C) en moet tevens de incubatietemperatuur verhoogd worden naar $40 \pm 0,5^\circ\text{C}$.
- Een pH-tolerantie van 0,05 is niet gebruikelijk. Onderzoek is nodig of de pH gesteld kan worden op $\text{pH } 7,3 \pm 0,1$ zonder dat dit de resultaten uit dit onderzoek beïnvloedt.
- Omdat slechts een beperkt aantal *Legionella*-soorten in dit onderzoek onderzocht zijn, kan het onderzoek worden voortgezet met andere beschreven *Legionella*-soorten om na te gaan of deze dezelfde resultaten opleveren als de non-pneumophila soorten die hier wel onderzocht zijn.
- Aanbevolen wordt het onderzoek voort te zetten met meer leidingwatermonsters, waarbij tevens ook de identiteit van de typische kolonies wordt bepaald.
- Opstellen van een normvoorschrift voor de kweek van *Legionella pneumophila*.

8 Literatuur

- VROM (2000). *Modelbeheersplan Legionella- preventie in leidingwater*
- VROM (2004). *Besluit van 26 oktober 2004 tot wijziging van het Waterleidingbesluit hygiëne en veiligheid badinrichtingen en zwemaangelegenheden (preventie van Legionella in leidingwater. Staatsblad 2004.576*
- NEN (1991). *Bacteriologisch onderzoek van water. Onderzoek naar de aanwezigheid en aantal kolonievormende eenheden van Legionellabacteriën. NEN 6265*
- NEN 2003. *Wijzigingsblad bij: Bacteriologisch onderzoek van water. Onderzoek naar de aanwezigheid en aantal kolonievormende eenheden van Legionellabacteriën. NEN 6265/ A1*
- In 't Veld, S en J. de Wagt (2002). *Snelle herziening van NEN 6265 Legionella-onderzoek aanbevolen. H2O nr. 9, pag 15-16.*
- Kooij, D., H.R. Veenendaal en B.A. Wullings (2003). *Kwantitatieve bepaling van Legionella in water: na 21 jaar nog in de kinderschoenen! H2O nr. 4, pag 21-23*
- Oesterholt, F. en D. van der Kooij (2003). *Legionella in woninginstallaties. H2O nr. 4, pag. 21-22.*
- Wullings, B.A. en D. van der Kooij (2006). *Occurrence and Genetic Diversity of Uncultured Legionella spp. in Drinking Water Treated at Temperatures below 15°C. Applied and Environmental Microbiology vol. 72, no 1, p 157-166*
- Gezondheidsraad (2003). *Bestrijding van Legionella. Publicatie nr. 2003/12. ISBN 90-554-491-7.*
- Baggelaar, P.K. (1997) *Syllabus toegepaste statistiek voor waterlaboratoria, 2^e versie. KOA 98.085.*