

Legionella-Nährböden

BCYE α -Nährboden
 BMPA α -Selektivnährboden
 BCYE α -Nährboden ohne L-Cystein
 GVPC-Selektivnährboden
 MWY-Selektivnährboden

Zur Isolierung von Legionellen aus klinischem und Umweltmaterial sowie anderen Materialien.

Legionella-CYE-Agar-Basis

Art.-Nr. CM 655

Typische Zusammensetzung	(g/l)
Aktivkohle	2,0
Hefeextrakt	10,0
Agar	13,0
pH 6,9 \pm 0,1	

Legionella-BCYE α -Supplement

Art.-Nr. SR 110

Zusammensetzung je Röhrchen (1 Röhrchen je 100 ml)	
ACES-Puffer/Kaliumhydroxid	1,0 g
Eisen(III)-pyrophosphat	0,025 g
L-Cystein	0,04 g
α -Ketoglutarat	0,1 g

Legionella-BCYE α -Supplement wird auch in größerer Abfüllung angeboten: Art.-Nr. SR 110C (1 Röhrchen je 500 ml).

Legionella-BMPA-Selektiv-Supplement

Art.-Nr. SR 111

Zusammensetzung je Röhrchen (1 Röhrchen je 100 ml)	
Cephemandol	400 μ g
Polymyxin B	8 000 IE
Anisomycin	8 mg

Legionella-BMPA-Selektiv-Supplement wird auch in größerer Abfüllung angeboten: Art.-Nr. SR 111B (1 Röhrchen je 500 ml).

Nährböden

Legionella-BYE α -Supplement

Art.-Nr. SR 175

Zusammensetzung je Röhrchen

(1 Röhrchen je 100 ml)

ACES-Puffer/ Kaliumhydroxid	1,0 g
Eisenpyrophosphat	0,025 g
α -Ketoglutarat	0,1 g

Legionella-GVPC-Selektiv-Supplement

Art.-Nr. SR 152

Zusammensetzung je Röhrchen

(1 Röhrchen je 500 ml)

Glycin	1,5 g
Polymyxin B	40000 IE
Vancomycin	0,5 mg
Cycloheximid	40,0 mg

Legionella-MWY-Selektiv-Supplement

Art.-Nr. SR 118

Zusammensetzung je Röhrchen

(1 Röhrchen je 100 ml)

Glycin	0,3 g
Polymyxin B	5000 IE
Anisomycin	8 mg
Vancomycin	100 μ g
Bromthymolblau	1 mg
Bromkresolpurpur	1 mg

Legionella-MWY-Selektiv-Supplement wird auch in größerer Abfüllung angeboten: Art.-Nr. SR 118B (1 Röhrchen je 500 ml).

Zubereitung

BCYE α -Nährboden

(Buffered Charcoal Yeast Extract Agar mit α -Ketoglutarat) 2,5 g Legionella-CYE-Agar-Basis in 90 ml Aqua dest. suspendieren und bis zum vollständigen Lösen erhitzen. 15 Minuten bei 121°C autoklavieren und auf 50°C abkühlen. Zu einem Röhrchen Legionella-BCYE α -Supplement (OXOID, Art.-Nr. SR 110) aseptisch 10 ml steriles, warmes (50°C) Aqua dest. geben und mischen. Den gelösten Inhalt zu 90 ml steriler, auf 50°C abgekühlter Legionella-CYE-Agar-Basis geben. Mischen und Platten gießen. Zur Herstellung von 500 ml Nährboden wird das Legionella-BCYE α -Supplement (OXOID, Art.-Nr. SR 110C) in 50 ml sterilem, warmem Aqua dest. gelöst und zu 450 ml steriler, auf 50°C abgekühlter Legionella-CYE-Agar-Basis gegeben.

BMPA α -Selektivnährboden

(Buffered Medium mit Polymyxin B, Anisomycin und α -Ketoglutarat) 2,5 g Legionella-CYE-Agar-Basis in 90 ml Aqua dest. suspendieren und bis zum vollständigen Lösen erhitzen. 15 Minuten bei 121°C autoklavieren und auf 50°C abkühlen. Zu einem Röhrchen Legionella-BCYE α -Supplement (OXOID, Art.-Nr. SR 110) aseptisch 10 ml steriles, warmes (50°C) Aqua dest. geben und mischen. Zu einem Röhrchen Legionella-BMPA-Selektiv-Supplement (OXOID, Art.-Nr. SR 111) aseptisch 2 ml steriles Aqua dest. geben und mischen. Den gelösten Inhalt der beiden Supplemente zu 90 ml steriler, auf 50°C abgekühlter Legionella-CYE-Agar-Basis geben. Mischen und Platten gießen. Zur Herstellung von 500 ml Nährboden wird das Legionella-BCYE α -Supplement (OXOID, Art.-Nr. SR 110C) aseptisch in 50 ml sterilem, warmem Aqua dest. gelöst und das Legionella-BMPA-Supplement (OXOID, Art.-Nr. SR 111B) in 10 ml sterilem, warmem Aqua dest. gelöst.

Zubereitung der Legionella-Nährböden

	Ansatz-Volumen	Legionella Agar-Basis	BCYE α -Suppl.	BYE α -Suppl.	BMPA-Suppl.	GVPC-Suppl.	MWY-Suppl.
BCYE α -Nährboden	100 ml 500 ml	90 ml 450 ml	10 ml SR 110 50 ml SR 110C	- -	- -	- -	- -
BCYE α -Nährboden ohne L-Cystein	100 ml -	90 ml -	- -	10 ml SR 175 -	- -	- -	- -
BMPA α -Nährboden	100 ml 500 ml	90 ml 450 ml	10 ml SR 110 50 ml SR 110C	- -	2 ml SR 111 10 ml SR 111B	- -	- -
GVPC-Nährboden	- 500 ml	- 450 ml	- 50 ml SR 110C	- -	- -	- 10 ml SR 152	- -
MWY-Nährboden	100 ml 500 ml	90 ml 450 ml	10 ml SR 110 50 ml SR 110C	- -	- -	- -	2 ml SR 118 10 ml SR 118B

Der gelöste Inhalt der beiden Supplemente wird zu 450 ml steriler, auf 50°C abgekühlter Legionella-CYE-Agar-Basis gegeben.

BCYE α -Nährboden ohne L-Cystein

2,5 g Legionella-CYE-Agar-Basis in 90 ml Aqua dest. suspendieren und bis zum vollständigen Lösen erhitzen. 15 Minuten bei 121°C autoklavieren und auf 50°C abkühlen. Zu einem Röhrchen BYE α -Supplement (OXOID, Art.-Nr. SR 175) 10 ml steriles, warmes (50°C) Aqua dest. geben und mischen. Den gelösten Inhalt zur Nährbodenbasis geben, gut mischen und Platten gießen. Der gebrauchsfertige Nährboden sollte einen pH-Wert von $6,9 \pm 0,1$ aufweisen.

GVPC-Selektivnährboden

(Selektivnährboden mit Glycin, Vancomycin, Polymyxin B und Cycloheximid)

12,5 g Legionella-CYE-Agar-Basis in 450 ml Aqua dest. suspendieren und bis zum vollständigen Lösen erhitzen. 15 Minuten bei 121°C autoklavieren und auf 50°C abkühlen.

Zu einem Röhrchen Legionella-BCYE α -Supplement (OXOID, Art.-Nr. **SR 110C**) aseptisch 50 ml steriles, warmes (50°C) Aqua dest. geben und mischen. Zu einem Röhrchen Legionella-GVPC-Selektiv-Supplement (OXOID, Art.-Nr. SR 152) aseptisch 10 ml steriles Aqua dest. geben und mischen. Den gelösten Inhalt der beiden Supplemente zu 450 ml steriler, auf 50°C abgekühlter Legionella-CYE-Agar-Basis geben. Mischen und Platten gießen.

Für den Legionella-GVPC-Selektivnährboden sollte Legionella-BCYE α -Supplement (OXOID, Art.-Nr. **SR 110C**) eingesetzt werden, da bei dieser Abfüllung 1 Röhrchen 500 ml Nährboden supplementiert.

MWY-Selektivnährboden

(Medium nach Wadowsky und Yee¹², modifiziert von Edelstein¹³)

2,5 g Legionella-CYE-Agar-Basis in 90 ml Aqua dest. suspendieren und bis zum vollständigen Lösen erhitzen. 15 Minuten bei 121°C autoklavieren und auf 50°C abkühlen. Zu einem Röhrchen Legionella-BCYE α -Supplement (OXOID, Art.-Nr. SR 110) aseptisch 10 ml steriles, warmes (50°C) Aqua dest. geben und mischen. Zu einem Röhrchen Legionella-MWY-Selektiv-Supplement (OXOID, Art.-Nr. SR 118) aseptisch 2 ml steriles Aqua dest. geben und mischen. Den gelösten Inhalt der beiden Supplemente zu 90 ml steriler, auf 50°C abgekühlter Legionella-CYE-Agar-Basis geben. Mischen und Platten gießen. Zur Herstellung von 500 ml Nährboden das Legionella-BCYE α -Supplement (OXOID, Art.-Nr. **SR110C**) aseptisch in 50 ml sterilem, warmem Aqua dest. lösen und das Legionella-MWY-Supplement (OXOID, Art.-Nr. **SR 118B**) in 10 ml sterilem, warmem Aqua dest. lösen. Den gelösten Inhalt der beiden Supplemente zu 450 ml steriler, auf 50°C abgekühlter Legionella-CYE-Agar-Basis geben.

Beschreibung

Fallon¹ beschrieb die Entdeckung des Erregers der Legionärskrankheit. *Legionella pneumophila* wurde zuerst isoliert, indem Meerschweinchen und fertile Hühnerierei infiziert wurden². Inzwischen sind bei der Kultivierung des Keims aus klinischem Material und bei der Koloniezähl-

bestimmung von *Legionella* spp. aus Umweltmaterial erhebliche Fortschritte erzielt worden.

BCYE α -Nährboden

Feeley et al.³ beschrieben eine Modifikation des F-G-Agars (Feeley-Gorman-Agar)⁴, in dem Caseinhydrolysat durch Hefeextrakt als Proteinquelle ersetzt wurde. Weiterhin tauschten sie Stärke gegen Aktivkohle (Norit A) bei einer Konzentration von 2% (w/v) aus. Dieser Nährboden, den sie CYE-Agar³ nannten, wurde weiter mit ACES-Puffer und α -Ketoglutarat supplementiert und ist in der Literatur als BCYE α -Nährboden beschrieben⁵. BCYE α -Nährboden erzielt optimale Wiederauffindungsraten von Legionellen in kürzerer Bebrütungszeit aus Umweltmaterial und klinischem Untersuchungsmaterial⁶. Zur Zeit gilt ein gepufferter Kohle-Hefeextrakt-Nährboden allgemein als der Basisnährboden der Wahl⁷, dem dann verschiedene antimikrobielle Substanzen zur Erhöhung der Selektivität zugesetzt werden.

BCYE α -Nährboden basiert auf der Zusammensetzung von Edelstein⁵ und wird aus Legionella-CYE-Agar-Basis und dem Legionella-BCYE α -Supplement hergestellt. Das lyophilisierte Supplement enthält ACES-Puffer/Kaliumhydroxid, α -Ketoglutarat, Eisenpyrophosphat und L-Cystein. Zum Basisnährboden zugesetzt, stabilisiert es den pH-Wert des endgültigen Nährbodens bei $6,9 \pm 0,1$ und stellt essentielle Wachstumsfaktoren zur Verfügung. BCYE α -Nährboden wird durch den Zusatz von Glycin⁸ und antimikrobiellen Agenzien^{5,8} zu einem für Legionellen selektiven Nährboden und entspricht ISO 11731¹⁰.

BCYE α -Nährboden ohne L-Cystein

Legionellen benötigen zum Wachstum die Aminosäure L-Cystein. Der BCYE α -Nährboden, der **kein** Cystein enthält, ermöglicht den Nachweis der Abhängigkeit von dieser Aminosäure im Vergleich zu einem cysteinhaltigen Nährboden. Legionellen dürfen auf dem BCYE α -Nährboden ohne L-Cystein **nicht** wachsen. Isolate, die auf **BCYE α - Nährboden mit L-Cystein** wachsen, nicht aber auf **BCYE α -Nährboden ohne L-Cystein**, können präsumtiv als *Legionella* spp. identifiziert werden.

Der BCYE α -Nährboden ohne L-Cystein basiert auf einer Weiterentwicklung des von Feeley et al. modifizierten F-G-Agars und entspricht der ISO 11731¹⁰.

BMPA α -Selektivnährboden

Dieser Nährboden enthält Polymyxin B und Cephamandol. Die Zusammensetzung dieses semi-selektiven Nährbodens wurde von Edelstein⁵ zur Isolierung von *L. pneumophila* aus kontaminiertem klinischem und Umweltmaterial empfohlen.

GVPC-Selektivnährboden

Das Legionella-GVPC-Selektiv-Supplement basiert auf der Zusammensetzung, die von Dennis et al.⁹ beschrieben wurde. Diese selektive Zusammensetzung gilt als die erfolgreichste *in vitro* Methode zur Isolierung von *L. pneumophila*, wenn sie in Verbindung mit Hitze- oder Säurebehandlungen eingesetzt wird.

Die Zusammensetzung enthält Cycloheximid, da es eine stärkere fungistatische Aktivität als Anisomycin besitzt. Anisomycin ist nämlich ausschließlich gegen Hefen aktiv. In Wasserproben, die auf Legionellen untersucht werden, kommen aber gewöhnlich häufiger Pilze vor als Hefen.

Vancomycin und Polymyxin B hemmen gemeinsam das Wachstum der meisten grampositiven und -negativen Bakterien.

Der GVPC-Selektivnährboden entspricht ISO 11731¹⁰.

MWY-Selektivnährboden

Dieser Nährboden enthält Polymyxin B, Anisomycin, Vancomycin und Glycin sowie Bromkresolpurpur und Bromthymolblau, um die Kolonien zur besseren Identifizierung zu färben^{11,14}. Edelstein¹³ bewertete diesen Nährboden als optimal zur Isolierung von *L. pneumophila* aus Trinkwasserproben.

Der Ausstrich von Umweltmaterial sowohl vor als auch nach der Behandlung mit saurem Puffer (pH 2,2) erhöht die Ausbeute.

Insgesamt ist der MWY-Selektivnährboden selektiver als der BMPA α -Selektivnährboden. Obwohl ersterer wahrscheinlich für klinisches Untersuchungsmaterial besonders geeignet ist, liegen bis jetzt nur wenige experimentelle Untersuchungen vor⁶.

Kulturverfahren

Klinisches Untersuchungsmaterial

Aufgrund der schlechten Prognose der durch Legionellen verursachten Pneumonie ist die schnelle Diagnose oft lebensentscheidend. Deshalb sind bei Verdacht sofort und möglichst noch vor Behandlungsbeginn alle für den Erregernachweis in Betracht kommenden Proben wie Sputum, Tracheobronchialsekret, Pleurapunktat, Blut, Liquor, Abszesseiter, Exsudate usw. zu entnehmen und möglichst rasch zum Labor zu senden. Wenn das Untersuchungsmaterial austrocknen kann, sind Transportnährböden erforderlich. Einzelheiten zum Gang der Untersuchung sind bei Ruckdeschel¹⁵ zu finden.

1. Homogenisiertes Material sowohl mit Fluorescein-markierten Antiseren (Fluoreszenz-Antikörper-Technik, FAT) wie auch mit der Gramfärbung auf andere Bakterien untersuchen.
2. Das Untersuchungsmaterial in Caseinpepton-Sojamehlpepton-Bouillon oder einer anderen NaCl-armen Lösung 1:10 verdünnen und durch Schütteln homogenisieren.
3. FAT-positive Proben, die in der Gramfärbung keine bakterielle Begleitflora aufwiesen, auf BCYE α -Nährboden kultivieren. FAT-positive und auch -negative Proben, in denen durch Gramfärbung andere Keime nachgewiesen wurden, auf BMPA α -Selektivnährboden kultivieren. Zur Bekämpfung der Begleitflora sollten die Proben hitze- oder säurebehandelt werden, wobei beide Verfahren gleichgut geeignet sind¹⁵.

a) Hitzebehandlung

Verdünnte oder suspendierte Proben 30 Minuten in ein Wasserbad bei 50°C stellen.

b) Säurebehandlung

Probe 1:10 mit KCl-HCl-Puffer (s.u.) verdünnen und vor dem Beimpfen 5 Minuten bei Raumtemperatur stehen lassen.

4. Die Platten bei 36°C in 90%iger relativer Luftfeuchtigkeit in normaler oder mit 2,5% CO₂-Atmosphäre bebrüten.
5. Wachstum zeigt sich in der Regel nach 2-3 Tagen; Platten jedoch über 14 Tage täglich begutachten, bevor sie entsorgt werden.

HCl-KCl-Puffer

23,4 ml 1 N HCl und 11,8 g KCl (Plätzchen) in 843,6 ml Aqua dest. lösen, mit 1 M KOH auf pH 2,2 einstellen. 20 Minuten bei 121°C autoklavieren. Unbegrenzt haltbar.

Kulturverfahren

Umweltmaterial

Von einigen Autoren^{7,10} wird bei Umweltmaterial mit Begleitflora empfohlen, drei Platten zu beimpfen: eine nach der Hitzevorbehandlung, eine nach der Säurevorbehandlung und eine mit nicht vorbehandeltem Probenmaterial.

1. Für die Hitzebehandlung 10 ml konzentrierte Probe⁷ entnehmen und 30 Minuten in ein Wasserbad bei 50°C stellen.
2. Für die Säurebehandlung 10 ml konzentrierte Probe⁷ entnehmen und 20 Minuten bei 2500 UpM in verschlossenen Röhrchen zentrifugieren; Überstand bis auf 1 ml dekantieren, 9 ml HCl-KCl-Puffer zufügen und 5 Minuten vorsichtig bei Raumtemperatur schütteln.
3. Für die Animpfung ohne Vorbehandlung 10 ml konzentrierte Probe⁷ entnehmen.
4. Jeweils 0,1 ml der drei Teilproben, die wie oben beschrieben vorbehandelt bzw. nicht vorbehandelt sind, auf GVPC-Selektivnährboden austreichen.
5. Platten bei 36°C in 90%iger relativer Luftfeuchtigkeit aerob oder besser in 2,5%iger CO₂-Atmosphäre bebrüten und eine Woche lang täglich begutachten.
6. Verdächtige Legionella-Kolonien auf Caseinpepton-Sojamehlpepton-Agar mit 5% Schafblut (OXOID, Art.-Nr. CM 131 + SR 51) und auf BCYE α -Nährboden subkultivieren. Isolate, die auf BCYE α -Nährboden, jedoch nicht auf Caseinpepton-Sojamehlpepton-Blut-Agar wachsen und die charakteristische Morphologie aufweisen, können vorläufig als Legionella angesehen werden. Eine Bestätigung mit biochemischen und serologischen Testungen muß erfolgen¹⁶, z.B. mit dem Legionella-Latex-Test (OXOID, Art.-Nr. DR 800).

Alternatives Kulturverfahren für Umweltmaterial

1. 10 ml konzentrierte Probe⁷ entnehmen und 20 Minuten bei 2500 UpM in verschlossenen Röhrchen zentrifugieren.
2. Überstand bis auf 1 ml entfernen und das Zentrifugat im verbliebenen Überstand resuspendieren, dies bildet das Inokulum.
3. Davon 0,1 ml auf BCYE α -Nährboden und BMPA α -Selektivnährboden oder/und MWY-Selektivnährboden mit einem sterilen Spatel austreichen.
4. Zur restlichen Suspension 9 ml HCl-KCl-Puffer (s.o.) zufügen, vorsichtig schütteln und 5 Minuten bei Raumtemperatur stehen lassen.
5. 0,1 ml der säurebehandelten Suspension auf BCYE α -Nährboden austreichen.
6. Die Platten bei 36°C in 90%iger relativer Luftfeuchtigkeit aerob oder in 2-5%iger CO₂-Atmosphäre bebrüten und eine Woche lang täglich begutachten.
7. Verdächtige Legionella-Kolonien auf Caseinpepton-Sojamehlpepton-Agar mit 5% Schafblut und auf BCYE α -Nährboden subkultivieren.

Isolate, die auf BCYE α -Nährböden, jedoch nicht auf Caseinpepton-Sojamehlpepton-Blut-Agar wachsen und die charakteristische Morphologie aufweisen, können vorläufig als Legionellen angesehen werden. Eine Bestätigung mit biochemischen und serologischen Testungen muß erfolgen,¹⁶ z.B. mit dem Legionella-Latex-Test (OXOID, Art. Nr. DR 800).

Die beschriebenen Nährböden sind für *Legionella* spp. nicht vollständig selektiv. Es wird daher empfohlen¹¹, folgende Kriterien bei der Begutachtung der Platten heranzuziehen:

- bei mikroskopischer Untersuchung weisen die Kolonien die charakteristische Farbe, Größe und Morphologie auf;
- die Isolate wachsen nicht auf Blutagar bzw. cystein-freiem Nährboden;
- die Keime verhalten sich in der Gramfärbung charakteristisch.

Legionella-Spezies können nicht allein aufgrund von Wachstumscharakteristika auf verschiedenen Nährböden oder aufgrund von biochemischen Testungen identifiziert werden. Es sollten weitere Untersuchungen z.B. zur DNA-Homologie, der Analytik zellulärer Fettsäuren und zur Serotypisierung erfolgen.

Je nach Untersuchungsmaterial können verdächtige Kolonien einer Primärkultur oder die native Probe parallel auf BCYE α -Nährböden **ohne** Cystein und BCYE α -Nährböden **mit** Cystein kultiviert werden. Dabei ist darauf zu achten, daß zuerst der cysteinfreie BCYE α -Nährboden inokuliert wird, um einen Transfer von Cystein auf den cysteinfreien Nährboden zu vermeiden.

Inokulierte Nährböden werden aerob bis zu 10 Tage bei 36°C und erhöhter Luftfeuchtigkeit inkubiert. Für Wasserproben wird eine Inkubation in einer Kohlendioxidangereicherten Atmosphäre empfohlen (2,5% CO₂).

Isolate, die auf BCYE α -Nährböden **mit** Cystein, nicht aber auf BCYE α -Nährböden **ohne** Cystein wachsen, können präsumtiv als *Legionella* spp. identifiziert werden. Einige thermophile Sporenbildner können nach Inkubation bei 35°C eine Morphologie aufweisen, die präsumtiven Legio-

nellen ähnlich ist. Diese Keime werden durch das Mitführen eines bei 55°C inkubierten BCYE α -Nährbodens als Kontrollplatte abgegrenzt, da Legionellen bei dieser Temperatur kein Wachstum zeigen.

Ein differenzierter Nachweis von *L. pneumophila* der Sero-Gruppe 1 und 2-14, sowie 7 weiterer *Legionella* spp. kann z.B. mit dem Legionella-Latex-Test (OXOID, Art.-Nr. DR 800) erfolgen.

Koloniemorphologie nach 2-3 Tagen Bebrütung bei 36°C auf BCYE α -Nährboden

L. pneumophila

Weiß, glänzende, runde, glatte, erhabene Kolonien mit glattem Rand, Ø 1-2 mm, die bei weiterer Bebrütung größer werden.

L. gormanii

Gelbbraune bis weiße oder cremefarbene, leicht erhabene, muköse Kolonien, Ø 1-2 mm.

Andere Legionellen (*L. micdadei*, *L. bozemanii*, *L. dumoffii*, *L. longbeachae* und *L. jordanis*)

Nicht unterscheidbar von *L. pneumophila*.

auf GVPC-Selektivnährboden

Legionella pneumophila

Weiß-grau-blaue Kolonien, Ø bis zu 2 mm, unter dem Binokular meist mit feiner, inhomogener Innenstruktur (wie winzige Glassplitter).

Die Kolonien aller Legionella-Spezies haben grundsätzlich das gleiche Erscheinungsbild, variieren aber in der Farbe (braun, hellgrün, tiefrot oder blauviolett).

Charakteristisches Verhalten in der Gramfärbung

Im Originalpräparat gramnegative, plumpe bis kokkoide, unregelmäßig gelagerte Stäbchen von 0,5 x 1-2 µm Größe.

Bei der Gramfärbung von Legionellen sollte Karbolfuchsin¹⁴ oder basisches Fuchsin¹⁵ zur Gegenfärbung benutzt werden; aber auch dann sind Legionellen von anderen gramnegativen Stäbchen nicht eindeutig zu unterscheiden.

Im Kulturpräparat erscheinen Legionellen als Stäbchen wie im Originalpräparat, es sind aber häufig auch pleomorphe Stäbchen und bis zu 100 µm lange Filamente zu finden.

Charakteristika von *Legionella* spp. (angelehnt an Balows¹⁴)

Keim	Primärisolierung auf BCYE α -Agar	Blut-Agar	Kolonie-Färbung*	Katalase	β -Lactamase	Oxidase	Hippurat	Gelatine-Verflüssigung	Beweglichkeit
<i>L. pneumophila</i>	+	-	weißgrün	+	+	v	+	+	+
<i>L. bozemanii</i>	+	-	grün	+	v	v	-	+	+
<i>L. dumoffii</i>	+	-	grün	+	+	-	-	+	+
<i>L. micdadei</i>	+	-	blaugrau	+	-	+	-	-	+
<i>L. gormanii</i>	+	-	grün	+	+	-	-	+	+
<i>L. longbeachae</i>	+	-	weißgrün	+	v	+	-	+	+
<i>L. jordanis</i>	+	-	weißgrün	+	+	+	-	+	+

* auf MWY-Selektivnährboden

+ = positive Reaktion; - = negative Reaktion; v = variable Reaktion.

Nährböden

Lagerung und Haltbarkeit

Trockennährboden:

Fest verschlossen, lichtgeschützt, 10-25°C.

Supplemente: 2-8°C.

Haltbarkeit: siehe Etikett.

Qualitätskontrolle

Bei der Qualitätskontrolle mit Legionellen sollten 'Wildstämme' benutzt werden, da Legionellen im Labor ihr Wachstum sehr schnell anpassen können. Sie können dann u.U. auf Nährböden wachsen, die das Wachstum von 'Wildstämmen' aus einer Primärisolierung nicht zulassen würden¹⁰. 'Wildstämme' können als Stämme definiert werden, die nicht öfter als zweimal nach der Primärisolierung subkultiviert wurden. Legionella-Selektivnährböden und besonders der GVPC-Selektivnährboden sollten nicht mit *L. pneumophila*-Stämmen getestet werden, die sich den Laborbedingungen bereits angepaßt haben. Bebrütung: 5 Tage aerob oder in 2-5%iger CO₂-Atmosphäre bei 36°C, jeweils in 90%iger Luftfeuchtigkeit¹⁰.

Positivkontrolle

Legionella pneumophila ATCC 33152

Negativkontrolle

Escherichia coli ATCC 25922

Staphylococcus epidermidis ATCC 12228

Zusätzliche Hinweise

Die Kulturen bei 36°C in 90%iger Luftfeuchtigkeit bis zu 10 Tagen bebrüten. Für Kulturen auf BCYE α -Nährboden ist eine erhöhte CO₂-Atmosphäre nicht notwendig. Für andere Nährböden und Wasserproben wird jedoch eine 2-5%ige CO₂-Atmosphäre empfohlen^{8,17}.

Mikroorganismen, die auf Blutagar genauso gut wie auf Legionella-Nährböden wachsen, sind keine Legionellen. Einige thermophile Sporenbildner können Legionella-Kolonien nach einer Bebrütung bei 36°C sehr ähneln. Diese Keime können mit Hilfe einer parallelen Bebrütung bei 36°C und bei 55°C nachgewiesen werden, da nur die thermophilen Keime bei der höheren Temperatur wachsen können, Legionella-Spezies dagegen über 45°C nicht.

Literatur

1. Fallon, J. (1979). Culture, September 1979, OXOID Limited, 3-4.
2. McDade, J.E. et al. (1977) N. Engl. J. Med. 297, 1197-1203.
3. Feeley, J.C. et al. (1979) J. Clin. Microbiol. 10, 437-441.
4. Feeley, J.C. et al. (1978) J. Clin. Microbiol. 8, 320-325.
5. Edelstein, P.H. (1981) J. Clin. Microbiol. 14, 298-303.
6. PHLS Communicable Diseases Report. (1983) CDR 83/49.
7. Dennis, P.J.L. (1988) "Isolation of Legionellae from environmental specimens". In: Harrison, T.G. und Taylor, A.G. (Hrsg.) "A laboratory manual for Legionella". John Wiley & Sons Ltd., Chichester.
8. Bopp, C.A. et al. (1981) J. Clin. Microbiol. 13, 714-719.
9. Dennis, P.J.L., Bartlett, C.L.R. und Wright, A.E. (1984) "Comparison of isolation methods for Legionella spp." In: Thornsbury, C. et al. (Hrsg.) "Legionella: Proceedings of the 2nd International Symposium". Am. Soc. Microbiol., Washington, D.C., S. 294-296.
10. ISO 11731: „Wasserbeschaffenheit - Nachweis und Zählung von Legionellen“ BSI Document (1989) "Determination of Legionellae in water and related materials. Method for their detection and enumeration." Draft Document, 89/53406.
11. Vickers, R.M., Brown, A. und Garrity, G.M. (1981) J. Clin. Microbiol. 13, 380-382.
12. Wadowsky, R.M. und Yee, R.B. (1981) Appl. and Environ. Microbiol. 42, 768-772.
13. Edelstein, P.H. (1982) J. Clin. Microbiol. 16, 697-699.

14. Balows, A. (Hrsg.) (1991) "Manual of clinical microbiology". ASM, Washington, D.C., 442-453.
15. Ruckdeschel, G. "Legionellaceae" in: Burkhardt, F. (Hrsg.) (1992) "Mikrobiologische Diagnostik". G. Thieme Verlag, Stuttgart, 153-158.
16. Vesey, G. et al. (1988) J. Appl. Bacteriol. 65, 339-345.
17. Edelstein, P.H. und Finegold, S.M. (1979) J. Clin. Microbiol. 10, 141-143.