

## · 技术方法 ·

# 应用简化和定量方法从空调冷却水中培养分离军团菌

胡君生 夏建英 杨兰萍 庄昕 陈长怡

**【摘要】** 目的 建立简便技术并用于调研该地区空调冷却水中军团菌的分布等。方法 用简法配制军团菌培养基;以烛缸取代 CO<sub>2</sub> 培养箱;仅依据菌落形态的符合和在血琼脂上不生长初判军团菌,并用简式作定量。结果 应用简化和定量的方法于 1997 年 7 月至 1999 年 6 月,从上海市卢湾区 6 类建筑物 47 个定点的 371 件空调冷却水样中,检出了 185 件军团菌,检出率达 49.87%,其中地铁站达 69.36%。结论 建立了简化的军团菌培养分离和定量法,以此法在历经 3 年较系统的定点调研中,检出率达 49.87%,非常显著地高于国内已发表的资料而与国外相近。其中地铁站冷却水的军团菌检出率和菌量均最高,故其传播军团病的危险性应引起注意。

**【关键词】** 军团菌;空调冷却水;简化法

**A simplified and quantitative method for culturing and isolating *Legionella* from air condition cooling waters** HU Junsheng, XIA Jianying, YANG Lanping, et al. Luwan Center for Disease Control and Prevention, Shanghai 200025, China

**【Abstract】 Objective** To establish simplified technique to investigate the distribution of *Legionella* from air condition cooling waters in a district in Shanghai. **Methods** Using simplified method to make GVPC agar plates; using candle jar to replace CO<sub>2</sub> incubator; initial identification was only relied on colony appearance but no growth on the blood agar plate; and a simple formula was used to quantify the *Legionella* in waters. **Results** From July 1997 to June 1999 in Luwan District Shanghai, the simplified methods were used to culture and isolate 185 *Legionella* strains from 371 water samples (47 fixed spots of hotels, markets, resident buildings, hospitals, subway stations, cinemas and stadiums), with a detection rate of 49.87% with highest at the subway stations (69.36%), which were significantly higher than reported in the literature in this country and abroad. **Conclusions** Simplified methods were established for culturing, isolating and quantifying *Legionella*. These methods had been used for 3 years to have got a high *Legionella* detection rate from the cooling waters. The high detection rate and quantity of *Legionella* in cooling waters of subway stations call for more attention to the fact that Legionellosis might exist in these waters.

**【Key words】** *Legionella*; Air condition cooling water; Simplified method

自 1976 年发现军团病以来,因其病情重和病死率高而引起重视。目前,国外已有大量资料证实,本菌是微生物肺炎的前三位病原之一。水是军团菌的自然栖息地,尤其在空调冷却水和人工管道水中广泛存在,是本病的主要传染来源<sup>[1-4]</sup>。但是,由于本菌的培养分离方法较繁琐,故国内至今对外环境中军团菌的存在,仅有一些较零散的报道,且与国外比较其检菌率明显偏低<sup>[5-9]</sup>。

从简化方法入手,对 1997~1999 年上海市卢湾区及其邻近地区各种建筑物中的空调冷却水,进行

了历经 3 年的观察研究,获得很高的军团菌检出率,为我国军团病流行病学研究提供了一定的基础资料,并向同行推荐所获方法。

## 材料与方法

### 一、水样采集

于 1997 年 7 月至 1999 年 6 月,选取 15 家大宾馆,15 家大商场或大商店,4 座商住大楼,4 所大医院,3 个地铁站,6 家电影院和体育场馆共 47 个单位,以灭菌玻瓶总计采集空调冷却水 371 件,每件 500 ml。立即送实验室当日检验。

### 二、水样处理和检验

将水样摇匀后静置 15 min,取 400 ml 水用装有

0.22  $\mu\text{m}$  孔径滤膜的针筒滤器(上海医药工业研究院生产)将水过滤。然后取下滤膜并剪碎,与 5 ml 原水样混合并振荡 3 ~ 5 min ;再从中取 1 ml 水与等量 pH 2.0 的 0.01 mol/L 的盐酸液混合,静置 5 ~ 10 min 后用 0.03 mol/L 的氢氧化钾液(约 0.2 ml)中和至 pH 约 6.9 作酸处理。最后取 0.1 ml 接种于 GVPC 琼脂(在 BCYE $\alpha$  琼脂基础上,加入甘氨酸、万古霉素、多粘菌素 B 和放线菌酮)平板上,用三角环推干后放入烛缸中,36 $^{\circ}\text{C}$  孵育 3 ~ 6 d 观察结果,挑取可疑菌落作鉴定。

三、军团菌的鉴定和保存

1. 初步鉴定 :凡菌落形态符合,血平板上不生长者,可初步认定为军团菌。再辅以革兰氏染色涂片镜检和血清分型。

2. 最终鉴定 :本文所获全部军团菌株均经各项军团菌表型鉴定项目认定<sup>[2,10]</sup>。

3. 菌株保存 :全部菌株均保存于含 15% 甘油不含炭粉和琼脂的 BCYE $\alpha$  液体培养基管中,放 - 30 $^{\circ}\text{C}$  可保存两年以上。

以上方法中的简化要点是 :采用简易小包装军团培养基和成套试剂(上海奥普生物科技公司生产)<sup>[10]</sup> ;用烛缸代替 CO $_2$  培养箱,和仅依据菌落形态与在血琼脂上生长与否即可初判军团菌。

四、水样中军团菌数的定量法

定量公式 :每 ml 水样中的军团菌数 = 平板上的军团菌菌落数  $\div$  (400  $\div$  5  $\div$  2.2  $\times$  0.5  $\times$  0.1) = 平板上菌落数  $\div$  1.82。

括号中的内容表达为在水样检验过程中,每 ml 水中军团菌被稀释倍数,即 400 ml 水经滤膜后又被 5 ml 水稀释( $\div$  5),再按 1 ml 水样被 1 ml 酸液和 0.2 ml 碱液稀释( $\div$  2.2);及补偿原水中军团菌数受酸作用后菌数的下降( $\times$  0.5),以及接种琼脂平板时仅用 0.1 ml( $\times$  0.1)。

结 果

一、卢湾区空调冷却水中军团菌检出情况

可见在总计 371 件水样中有 185 件检出军团菌,其检出率达 49.87%。其中地铁站的检出率高达 69.36%(表 1)。

二、水样中军团菌活菌数的测定

1. 卢湾区空调冷却水样中军团菌活菌数的定量测定 :比较不同场所阳性水样的军团菌浓度,仍是地铁站的活军团菌数最高(表 2)。

2. 三种培养条件下空调冷却水标本中,军团菌的检出和活菌数的测定见表 3。在 3% CO $_2$  培养箱、烛缸和密封的普通玻璃缸等 3 种培养条件下,36 $^{\circ}\text{C}$  培养的 50 件水样中有 23 件(40%)检出了军团菌,且其活军团菌数的测定也无明显差别,说明采用烛缸等简便方法培养军团菌标本是可行的。

三、军团菌的鉴定

通过初步鉴定的 190 株军团菌(在 185 件阳性水样中有 5 件同时分离出两种血清型菌),又分别作了氧化酶、触酶、马尿酸盐水解、明胶液化、产棕色色素、胞内荧光、 $\beta$ -内酰胺酶和无半胱氨酸 BCYE $\alpha$  琼脂等各项试验,结果均符合军团菌的鉴定标准。各菌株的血清分型情况为 :嗜肺军团菌血清 1 型 175 株(92.10%) 3 型 1 株(0.53%) 6 型 6 株(3.16%),米克戴德型 1 株(0.53%) 和不能分型 7 株(3.68%)。

讨 论

我们从 371 件空调冷却水样中的 185 件检出军团菌,检出率达 49.87%,这证明了所用的方法有很好的培养分离效果,而且稳定可靠。与国外空调水军团菌检出率一般在 30% ~ 50% 的结果相近<sup>[14]</sup>;这与国内近 20 年来军团菌检出率明显偏低的事实相比较<sup>[5-9]</sup>,不能不说是一个明显的进步。本文参

表1 上海市卢湾区空调冷却水中军团菌检出情况

采样时间	(1) 宾馆 (15 家)	(2) 商场 (15 家)	(3) 商住楼 (4 座)	(4) 医院 (4 所)	(5) 地铁站 (3 个)	(6) 文体场所 (6 家)	(7) 合计 (检出率 %)
1997 年 7 ~ 12 月	20/45*	15/32	13/17	8/14	18/23	5/10	79/141( 56.03 )
1998 年 1 ~ 12 月	28/52	13/45	11/23	13/24	21/31	11/34	97/209( 46.41 )
1999 年 1 ~ 6 月	2/4	0/1	1/2	1/4	4/8	1/2	9/21( 42.86 )
合计(检出率 %)	50/101( 49.51 )	28/78( 35.90 )	25/44( 56.82 )	22/42( 52.38 )	43/62( 69.36 )	17/46( 36.96 )	185/371( 49.87 )

\* 分母为检验水样数,分子为分离出军团菌的水样数 (5):(1)  $\chi^2 = 6.18, P < 0.05$  (5):(2) (6)  $\chi^2 = 15.47, 11.24, 8.09, P < 0.01$

表2 上海市卢湾区不同场所阳性空调冷却水样中军团菌活菌数的定量测定结果

每 ml 水样中的军团菌数	宾馆 (15 家)	商场 (15 家)	商住楼 (4 座)	医院 (4 所)	地铁站 (3 个)	文体场所 (6 家)	总阳性水样数 (构成比%)
< 10	17	12	8	9	12	5	63(34.05)
10 ~ 99	29	11	14	9	17	9	89(48.11)
100 ~ 499	3	5	3	4	9	2	26(14.05)
500 ~ 999	1	0	0	0	4	1	6(3.25)
> 1 000	0	0	0	0	1	0	1(0.54)
总水样数	50	28	25	22	43	17	185(100.00)

表3 50 件空调冷却水标本中 3 种培养条件下军团菌的检出和定量

每 ml 水样中军团菌活菌数	CO <sub>2</sub> 培养箱 (含 3% CO <sub>2</sub> )	36℃ 培养 烛缸	普 通 玻璃缸
< 10	9	8	10
10 ~ 99	12	14	11
100 ~ 499	2	1	1
500 ~ 999	0	0	0
阳性水样数	23	23	22
三法共同阴性水样数	27	27	27

考前方法<sup>[8]</sup>并作了简化和定量的研究。此法不仅效果好,而且比国外方法简便,培养基的配制也简单,省略了价格昂贵且使用钢瓶麻烦的 CO<sub>2</sub> 培养箱,尤其是仅根据菌落形态和在血琼脂上的生长与否即可初判军团菌(本文 190 株通过初判的菌,其最终鉴定证明无一株菌错判)等均显著简化了操作。这些使本法较适合于防病和临床实验室,有利于我国军团病防治工作的开展。而水标本军团菌定量方法的建立,有助于军团病流行病学研究工作,国内尚未见到报道。在设计公式时,因国外资料<sup>[11]</sup>和我们的实验均证明酸处理本身确能降低水标本中军团菌的活菌数,故在公式中采取了补偿措施。

在 1990 年,美国制冷制热和空调工程师协会年会上提出,可根据空调冷却水中军团菌的含量,来评估军团病发病和爆发流行的危险,认为水中军团菌活菌数超过 1 000 个/ml 时,就应立即采取控制措施<sup>[12]</sup>。从本文表 2 的结果看,黄坡南路地铁站有一件标本菌浓度超过 1 000 个/ml,且地铁总体军团菌含量较其他场所为高,应引起有关方面注意。但是,从预防军团病的角度,目前国外的注意力集中在如何从空调水和人工管道水存在的大量军团菌中,鉴别出对人体有危险性的菌株上<sup>[13]</sup>。虽然,环境水中大量的军团菌对健康人多为无毒或低毒菌,然而对于免疫力低下甚至缺乏的人群例如白血病等恶性肿瘤患者、肾功能衰竭者以及其他患种种慢性消耗性疾病使身体极端衰弱者等,这些菌也仍然是危险的。

而且研究证明了军团菌可通过种种因素进一步增强毒力,最终可能危及健康人造成爆发流行。例如通过在原虫中的繁殖(而这种原虫在空调冷却塔及人工管道水中不仅广泛存在,而且是其保存宿主)<sup>[14]</sup>。为此,国外对环境水中军团菌危险性的监测工作正在进行,如采用单克隆抗体和某些分子生物学方法对水中军团菌作进一步分型,以试图鉴别出具有毒力的菌株,并在必要时采取相应的预防性对策。如通过提高封闭水体的温度或加消毒剂等来消除或降低军团菌浓度等<sup>[15]</sup>,这也为我们今后的研究方向提供了参考。

参 考 文 献

1 Stout JE, Yu VL. Legionellosis. N Engl J Med ,1997 ,337:682-687.

2 武建国,主编.军团菌病.南京:东南大学出版社,1990.

3 Bhopal R. Source of infection for sporadic Legionnaires ' disease : a review. J Infect ,1995 ,30:9-12.

4 Keller DW. Community outbreak of Legionnaires ' disease : an investigation confirming the potential for cooling towers to transmit Legionella species. Clin Infect Dis ,1996 ,22:257-261.

5 唐英春,黄玲,廖适生.从空调系统冷却塔水中分离出军团病杆菌.中华流行病学杂志,1985 ,6:193-195.

6 龚昌仟.空调冷却塔水中军团菌消长调查.中华预防医学杂志,1993 ,27:156.

7 魏婉江,谢哲子,郭淑清,等.山西水环境军团菌分布及生物学特性研究.中国微生物学杂志,1994 ,6:1-6.

8 陈长怡,陈悦,薛季鸣,等.上海市中央空调冷却水中分离军团菌的初步研究.上海预防医学,1997 ,9:422-423.

9 罗隆泽,谢仁栋,吕强,等.四川省首次从空调冷却水中分离出嗜肺军团菌.中华流行病学杂志,1998 ,19:233.

10 陈长怡,徐建新.军团病实验诊断方法进展.临床肺科杂志,1999 ,4:236-237.

11 Collee JG, ed. McCartneys ' Practical Medical Microbiology Vol 2. P545 13thed Churchill Livingstone.1989.

12 Miller RD, Kenep KA. Risk assessment for Legionnaires ' disease based on routine surveillance of cooling towers for Legionella. In Barbaree JM , Breiman RF, Dufour AP. Legionella Washington, DC ASM ,1993. 40-43.

13 Visca P, Goldoni P, Luck PC, et al. Multiple types of Legionella pneumophila serogroup 6 in a hospital heated-water system associated with sporadic infections. J Clin Microbiol ,1999 ,37:2189-2196.

14 Cirillo JD, Falkow S, Tompkins LS. Growth of Legionella pneumophila in Acanthamoeba castellanii enhances invasion. Infect Immun ,1994 ,62:3254-3261.

15 Kusnetsov JM, Tulkki AI, Ahonen HE, et al. Efficacy of three prevention strategies against Legionella in cooling water systems. J Appl Microbiol ,1997 ,82:763-768.