

军团菌简介

《伯杰氏细菌分类手册》1994年第9版中，对军团菌（*Legionella*）作了如下说明：杆形菌，宽度0.3~0.9 μm，长度为2~20 μm以上，不形成内孢子或小囊，无荚膜，不产酸，革兰氏染色阴性，借一两根或以上直的或弯曲的极鞭毛和侧鞭毛可以运动，偶尔可见无动力菌株。需氧，生长时需L-半胱氨酸和铁盐。氧化酶阴性或弱阳性，硝酸盐还原试验阴性，尿素酶阴性，液化明胶。细胞壁中有支链脂肪酸。可从有机化合物中摄取营养，可利用氨基酸作为能量来源。不发酵碳水化合物，亦不能使之氧化。可从地表水、泥土和热水及污染的湖水和河水中分离到本菌，但从土壤和动物中分离尚不了解，对人有致病性，DNA的G+Cmol%含量为39~43%(TmBd)。

军团菌属有41个种，61个血清型。侵肺军团菌（*Legionella pneumophila, LP*）有15个血清型，是引起军团菌病的主要菌型（占80%以上）。军团菌病是一种急性呼吸道传染病，临床类型目前至少有肺炎型与庞蒂阿克热型。本病主要为呼吸道飞沫(气溶胶)传播。目前尚无证据表明感染者、病人或感染动物作为本病的传染源，通常把传染本菌的水源(天然水、人工管道水源、冷却塔、冷热管道系统水等)作为传染源。

军团菌的检测方法——ISO11731:1998

1. 范围

本标准描述了一种用于军团菌分离和估计环境样品中军团菌数量的培养方法。

该方法适用于所有环境样本，包括饮用水、工业用水和天然水以及沉淀物、沉积物和粘土/软泥等相关样本。

2. 培养基和试剂

2.1 Buffered Charcoal Yeast Extract agar medium (BCYE)

2.2 Buffered Charcoal Yeast Extract medium without L-cysteine (BCYE-Cys)

2.3 Buffered Charcoal Yeast Extract medium with selective supplements (GVPC)

2.4 酸处理缓冲液

3. 取样

3.1 取样容器

水样可采用玻璃、聚乙烯或类似容器。以前用过的容器应该清洗干净、扣干水分，121℃高压灭菌15min。如果容器不能经受高压灭菌，应在70℃的流动热水或流动蒸汽中处理至少5min。

3.2 含生物防腐剂的样品

如果水样中含有或被认为含有氧化型生物防腐剂，应在取样时或取样前加入非活性试剂

加以中和。

原则上讲，实验室接到水样后应尽快进行微生物学分析，最好是取样当天，尤其对于已知含生物防腐剂的样品。因此，建议从样品采集到制备好浓缩样的间隔最好为 2d，不应超过 5d，最长不超过 14d。

3.3 样品运输

样品应在 6-18℃条件下被运输，应避免热和光照，最好在 1d 内，不超过 2d 将样品送到指定实验室。

4. 制样

4.1 总则

如果液体样品军团菌的数量估计超过 $10^5/l$ ，可以采用直接平板法。为了确保低于这个数量样品中军团菌的检测，需采用浓缩技术。为了浓缩水样，可采用膜过滤法（4.2）或离心法（4.3）。

4.2 膜过滤法

如果样品是浑浊的、乳浊的或有颜色的，应采用离心法。

采用膜过滤装置进行膜过滤，采用直径 47-147mm，孔径 0.22 μm 和 0.45 μm 的膜。过滤后的膜应放置在带盖的无菌容器中，可用无菌剪刀剪碎，加 5ml-25ml 的无菌稀释液或无菌去离子水，不断摇动至少 2min。也可将容器放入超声波中 2-10min。

4.3 离心法

取 200ml 样品于 300-500ml 容积的离心瓶中，6000g 离心 10min 或 3000g 离心 30min，保持温度在 15-25℃，弃去上清液，将沉淀物悬浮在 2-20ml 无菌稀释液或无菌去离子水中。

5. 培养

5.1 将制备好的样品（浓缩的或未浓缩的）分成 3 份，1 份不做任何处理；1 份进行热处理；1 份进行酸处理。

5.2 热处理

加 $1 \pm 0.5ml$ 样品于一无菌容器中， $50 \pm 1^\circ C$ 水浴处理 $30 \pm 2min$ 。

5.3 酸处理

加 1-10ml 样品于一拧盖的容器中，6000g 离心 10min 或 3000g 离心 30min，用无菌枪头吸去一半体积的上清液，通过涡旋重新悬浮剩余物，用酸处理缓冲液补足原始体积。混合静置 $5 \pm 0.5min$ 。

5.4 选择性培养基的接种

分别接种未处理、热处理和酸处理的样品 0.1-0.5ml 于 GVPC 培养基上，热处理和酸处理的样品应在处理完立即接种，记录接种体积。

5.5 培养

翻转平板， $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 10d。

5.6 检查平板

在 10d 的培养期间，用显微镜在 2-4d 内至少观察 3 次，军团菌生长较慢，很可能被其他菌掩盖，记录每一种菌落形态的数量。

注：军团菌的菌落通常是白-灰-蓝-紫，但也可能出现棕色、粉色、灰绿色或深红色。军团菌表面光滑，边缘整齐，出现典型的毛玻璃现象。在紫外光下，*L.bozemanii*, *L.gormanii*, *L.dumoffii*, *L.anisa*, *L.cherrii*, *L.steigerwaltii*, *L.gratiana*, *L.tucsonensis* 和 *L.parisiensis* 有亮白色荧光；*L.rubrilucens* 和 *L.erythra* 呈现红色；*L.pneumophila* 菌落呈现暗绿色通常伴随有黄色。荧光的颜色有助于区分样品中军团菌的不同种。为了避免军团菌的死亡，不能将平板长时间暴露在紫外灯下。

6. 可疑军团菌的确证

6.1 BCYE 和其他培养基的二次培养

从每个 GVPC 平板上至少选择 3 个可疑军团菌菌落接种到 BCYE 和 BCYE-Cys 两块平板上进行二次培养， $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养至少 2d。在 BCYE 上生长而在 BCYE-Cys 上不生长的被认为是军团菌。通过血清学实验（6.2）确证在 BCYE 上生长而在 BCYE-Cys 上不生长的菌落。

注：血琼脂和营养琼脂可以代替 BCYE-Cys 培养基。

6.2 免疫荧光法鉴定军团菌