

团 体 标 准

T/CPMA XXXX-XXXX

水中嗜肺军团菌检验方法 酶底物定量法

Determination of *Legionella Pneumophila* for water-Enzyme substrate technique

（送审稿）

（本草案完成时间：2021.8.7）

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX – XX – XX 发布

XXXX – XX – XX 实施

发 布

前 言

本文件按照GB/T 1.1-2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件由北京市疾病预防控制中心提出。

本文件由中华预防医学会归口。

本文件起草单位：北京市疾病预防控制中心、中国疾病预防控制中心环境与健康相关产品安全所、北京市朝阳区疾病预防控制中心、北京市延庆区疾病预防控制中心、北京市门头沟区疾病预防控制中心、山东省泰安市疾病预防控制中心、湖北省十堰市疾病预防控制中心。

本文件主要起草人：张雅婕、牛春燕、李霞、任淑敏、张新峰、高艳、张永、张锐、刘海涛、杨康、苏健、张淑。

张雅婕



水中嗜肺军团菌检验方法 酶底物定量法

1 范围

本文件描述了水中嗜肺军团菌酶底物定量检验法。

本文件适用于冷却水、冷凝水和沐浴用水中嗜肺军团菌的检验，其他水质检验可参考本文件进行。
本方法定量限为 1 MPN/100 mL。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 18204.5 公共场所卫生检验方法 第5部分：集中空调通风系统

GB/T 18204.6 公共场所卫生检验方法 第6部分：卫生监测技术规范

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

嗜肺军团菌 *Legionella Pneumophila*

军团菌目、军团菌科、军团菌属中的一种杆菌。

注：菌体大小为 $(0.3\sim 0.4)\ \mu\text{m}\times (2\sim 3)\ \mu\text{m}$ 。无荚膜，无芽孢，有端生鞭毛，革兰染色阴性，常呈梭形，需在含L-半胱氨酸、铁离子等营养成分的培养基中生长。

3.2

最可能数 most probable number; MPN

稀释培养计数

一种基于泊松分布的间接计数方法。

注：利用统计学原理，根据一定体积不同稀释度样品经培养后产生的目标微生物阳性数，查表估计一定体积样品中目标微生物存在的数量（单位体积存在目标微生物的最可能数）。

4 方法原理

该方法基于一种细菌酶检验技术，嗜肺军团菌利用培养基中丰富的氨基酸、维生素和其他营养物质迅速地生长，经分解代谢作用与培养基中的酶底物发生反应使溶液浑浊或显褐色。

5 培养基与试剂

5.1 酶底物法培养基

5.1.1 成分

N-氨基甲酰甲基乙磺酸缓冲液（ACES）	10.0 g
酵母膏	3.5 g
硫酸镁	0.35 g
α -酮戊二酸	1.05 g
丙酮酸钠	0.45 g

氨基酸	4.7 g
硫代硫酸钠	0.007 g
二氯化锰	0.03 g
抗生素	0.35 g

5.1.2 制法

将以上成分按比例溶解在1000 mL无菌水中，121 °C高压灭菌15 min。

5.2 预处理液的配制

称取2.04 g雷伯环衍生物有机酸加入100 mL无菌水中混匀。

5.3 硫代硫酸钠溶液的配制

称取26 g硫代硫酸钠 ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 溶液（或16 g无水硫代硫酸钠），溶于1 L水中，并加热煮沸10 min，冷却，过滤后避光备用。

5.4 BCYE 培养基

5.4.1 成分

N-2-乙酰氨基-2-酰氨基乙烷磺酸（ACES）缓冲液	10.0 g
氢氧化钾	2.8 g
活性炭	2.0 g
酵母提取物（细菌级）	10.0 g
α -酮戊二酸钾盐	1.0 g
琼脂	12.0 g
L-半胱氨酸盐酸盐-水合物	0.4 g
焦磷酸铁（III）	0.25 g
水	1000 mL

5.4.2 制法

5.4.2.1 将0.4 g L-半胱氨酸盐酸盐-水合物加到10 mL水中。通过孔径为0.22 μm 的膜过滤器过滤，对溶液进行过滤灭菌。

5.4.2.2 将0.25 g 焦磷酸铁（III）加到10 mL水中。通过孔径为0.22 μm 的膜过滤器过滤，对溶液进行过滤灭菌。

5.4.2.3 将10 g N-2-乙酰氨基-2-酰氨基乙烷磺酸（ACES）缓冲液添加到含500 mL水的容器中，于45 °C~50 °C的水浴中溶解。用0.1 mol/L 氢氧化钾溶液和0.1 mol/L 硫酸溶液，将ACES缓冲溶液的pH调至 6.8 ± 0.1 。

5.4.2.4 将2.8 g 氢氧化钾添加到480 mL水中，并轻轻摇动使其溶解。

5.4.2.5 混合5.4.2.3、5.4.2.4中的两种溶液，并依次添加2 g 活性炭、10 g 酵母提取物和1 g α -酮戊二酸钾盐，每次添加之间要充分混合。加入琼脂，充分混合并在121 °C高压灭菌15 min后，在水浴中冷却至 (50 ± 2) °C。

5.4.2.6 无菌添加L-半胱氨酸（5.4.2.1）和焦磷酸铁（III）溶液（5.4.2.2），每次添加之前应充分混合。在25 °C下培养基的pH应为 6.8 ± 0.2 。

5.5 BCYE-cys 培养基

该培养基应按照5.4进行制备，但不添加L-半胱氨酸盐酸盐-水合物。

5.6 无菌水

使用符合三级水要求的实验用水，经121 °C高压灭菌15 min备用。

5.7 标准菌株

阳性对照标准菌株：嗜肺军团菌（CICC24883/ATCC33152或其它同类菌株）；

阴性对照标准菌株：粪肠球菌（CICC10396/ATCC29212或其它同类菌株）。

6 仪器设备

- 6.1 高压蒸汽灭菌器：121℃（0.10 MPa~0.12 MPa）。
- 6.2 干热灭菌器（烤箱）：60℃~80℃、160℃~180℃。
- 6.3 生化培养箱或恒温恒湿培养箱：36℃±1℃。
- 6.4 CO₂培养箱：CO₂浓度为2.5%、36℃±1℃。
- 6.5 三角瓶：带盖的无菌玻璃瓶或者聚乙烯瓶。
- 6.6 采样瓶（含硫代硫酸钠）：含0.1 mol/L 硫代硫酸钠（Na₂S₂O₃）的无菌广口玻璃瓶或者聚乙烯瓶。
- 6.7 程控定量封口机。
- 6.8 定量盘：定量培养用无菌塑料盘，含96个孔穴，其中6个大孔（13.7 mL/大孔），90个小孔（0.2 mL/小孔）。
- 6.9 定量盘橡胶衬垫：与96孔定量盘配套使用。
- 6.10 吸管：1 mL、10 mL 无菌玻璃吸管或可调式移液管。
- 6.11 试管：5 mL 或 10 mL 无菌带盖玻璃试管或者离心管。
- 6.12 量筒：100 mL±1 mL。
- 6.13 生物安全柜。

7 样品的采集

7.1 采样瓶的准备与灭菌

采样瓶准备时应添加硫代硫酸钠溶液（5.3）消除活性氯对嗜肺军团菌的干扰。

将浓度为0.1 mol/L硫代硫酸钠溶液与拟采集水样体积按照1：1000的比例加入采样广口玻璃瓶中，于160℃~180℃干热灭菌2 h，或用高压蒸汽灭菌器，121℃高压灭菌15 min。干热灭菌的采样瓶应在两周内使用；湿热灭菌的采样瓶如不能立即使用，应于60℃烤箱内将瓶内冷凝水烘干，两周内使用。

7.2 样品采集

按照GB/T 18204.5的要求采集冷却水和冷凝水，冷却水样品采集应在距冷却塔壁20 cm、液面下10 cm处，冷凝水样品采集应在排水管或冷凝水盘处；按照GB/T 18204.6的要求采集沐浴用水，沐浴用水样品采集应随机选择5个沐浴喷头；在沐浴池选择3个采样点，采集水面下30 cm处水样。每个采样点依无菌操作取样500 mL。

7.3 样品运输与保存

样品应在常温条件下避光保存，并在48 h内送往实验室开展检验。

8 检验步骤

8.1 稀释

根据对样品污染状况的估计，将样品稀释至可计数浓度范围。

稀释方法：以无菌操作方法吸取10 mL充分混匀的水样，加入到含有90 mL无菌水的三角瓶中，混匀成1：10的稀释液，按照同法递增稀释，每稀释一个浓度梯度，更换一支10 mL吸管。

8.2 接种

- 8.2.1 取100 mL配制好的酶底物法培养基到无菌三角瓶中备用。
- 8.2.2 取2 mL预处理液到无菌试管中。
- 8.2.3 将2 mL水样原液和/或稀释液分别加到含有2 mL预处理液的试管中，混匀，于常温下静置（60±5）s，静置结束前再次混匀试管内液体，并立即取2 mL加到100 mL酶底物法培养基（8.2.1）中混匀。
- 8.2.4 将8.2.3三角瓶中的液体全部加到96孔定量盘中，以手抚平96孔定量盘背面，赶除孔内气泡后用程控定量封口机封口。观察96孔定量盘颜色，若出现与阳性对照颜色相同，应终止试验或重新操作。

8.3 培养

将96孔定量盘纸面向下放置于 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的培养箱中培养7 d，且培养箱中水盘避免干涸。

8.4 对照试验

8.4.1 空白对照

制备1个100 mL无菌水样品，按照8.2和8.3的步骤进行操作。培养后的96孔定量盘应无任何颜色或浊度变化。

8.4.2 阴性对照

制备1个 $(10^3\sim 10^4)$ CFU/mL的100 mL粪肠球菌菌悬液，按照8.2和8.3的步骤进行操作。培养后的96孔定量盘应无任何颜色或浊度变化。

8.4.3 阳性对照

制备1个 $(10^2\sim 10^3)$ CFU/mL的100 mL嗜肺军团菌菌悬液，按照8.2和8.3的步骤进行操作。培养后的96孔定量盘应显褐色或浊度大于空白对照。

9 检验结果

9.1 未检出

将培养7 d后的定量盘取出观察。如所有孔穴内水样的颜色与浊度和空白对照无差异，可直接报告结果。结果报告为“未检出/100 mL”。

9.2 检出

如孔穴内的水样有显褐色或者浊度大于空白对照的，则表示该孔穴中含有嗜肺军团菌。记录所有显褐色或有浊度变化的孔穴数量，对照附录A中表A.1，查出其代表的嗜肺军团菌最可能数（MPN）。并按照公式(1)进行嗜肺军团菌浓度计算，结果采用两位有效数字的科学计数法表示，单位为MPN/100 mL。

$$c = \text{MPN 值} \times 100 \times b \dots\dots\dots (1)$$

式中：

c —— 嗜肺军团菌浓度，单位为MPN/100 mL；

MPN值 —— 96孔定量盘阳性孔数查表所得结果；

b —— 接种样品的稀释倍数。

9.3 菌型确定

如需对嗜肺军团菌阳性结果进行菌型确定，可按照附录B进行操作。

10 质量控制

10.1 每批样品应进行空白对照试验，并使用有证标准菌株进行阳性和阴性对照试验（8.4）。

10.2 按照质控要求，定期使用有证标准菌株/质控样品进行质量控制。

11 生物安全

嗜肺军团菌检验应按照三类病原微生物的生物安全要求进行管理。

附 录 A
(规范性)
96 孔定量盘 MPN 表

96孔定量盘MPN表见表A. 1。

表 A. 1 96 孔定量盘 MPN 表

小孔阳性孔 穴数	大孔阳性孔穴数						
	0	1	2	3	4	5	6
0	<1	1.1	2.3	3.9	5.8	8.4	12.6
1	1.0	2.2	3.5	5.2	7.4	10.4	15.5
2	2.0	3.2	4.7	6.6	9.0	12.4	18.7
3	3.0	4.3	5.9	7.9	10.6	14.6	22.3
4	4.0	5.4	7.2	9.4	12.3	16.9	26.4
5	5.0	6.5	8.4	10.8	14.1	19.4	31.0
6	6.0	7.7	9.7	12.3	15.9	21.9	36.1
7	7.0	8.8	10.9	13.8	17.8	24.6	41.6
8	8.1	9.9	12.2	15.3	19.8	27.5	47.4
9	9.1	11.0	13.5	16.8	21.7	30.5	53.4
10	10.1	12.2	14.8	18.4	23.8	33.5	59.6
11	11.1	13.3	16.1	20.0	25.9	36.7	65.9
12	12.1	14.5	17.5	21.6	28.0	40.0	72.3
13	13.2	15.6	18.8	23.3	30.2	43.3	78.8
14	14.2	16.8	20.2	24.9	32.4	46.7	85.4
15	15.2	18.0	21.5	26.6	34.7	50.1	92.1
16	16.3	19.1	22.9	28.3	37.0	53.6	98.9
17	17.3	20.3	24.3	30.1	39.3	57.1	105.7
18	18.3	21.5	25.7	31.8	41.6	60.6	112.7
19	19.4	22.7	27.1	33.6	44.0	64.2	119.8
20	20.4	23.9	28.5	35.3	46.4	67.8	126.9
21	21.4	25.1	30.0	37.1	48.8	71.5	134.2
22	22.5	26.3	31.4	38.9	51.2	75.1	141.6
23	23.5	27.5	32.9	40.7	53.7	78.8	149.0
24	24.6	28.7	34.3	42.6	56.1	82.5	156.6
25	25.6	29.9	35.8	44.4	58.6	86.3	164.4
26	26.7	31.1	37.2	46.2	61.1	90.1	172.2
27	27.7	32.4	38.7	48.1	63.6	93.9	180.1
28	28.8	33.6	40.2	49.9	66.1	97.7	188.2
29	29.9	34.8	41.7	51.8	68.6	101.6	196.4
30	30.9	36.1	43.1	53.7	71.1	105.5	204.8
31	32.0	37.3	44.6	55.6	73.7	109.4	213.3
32	33.1	38.5	46.1	57.5	76.2	113.3	221.9
33	34.1	39.8	47.6	59.4	78.8	117.3	230.7
34	35.2	41.0	49.2	61.3	81.4	121.3	239.6
35	36.3	42.3	50.7	63.2	84.0	125.4	248.7
36	37.3	43.5	52.2	65.1	86.6	129.5	258.0
37	38.4	44.8	53.7	67.1	89.3	133.6	267.4
38	39.5	46.1	55.3	69.0	91.9	137.7	277.1
39	40.6	47.3	56.8	71.0	94.6	141.9	286.9
40	41.7	48.6	58.3	72.9	97.2	146.1	296.9
41	42.8	49.9	59.9	74.9	99.9	150.4	307.1
42	43.8	51.2	61.4	76.8	102.6	154.7	317.5
43	44.9	52.5	63.0	78.8	105.4	159.0	328.1
44	46.0	53.7	64.5	80.8	108.1	163.4	339.0
45	47.1	55.0	66.1	82.8	110.8	167.8	350.1
46	48.2	56.3	67.7	84.8	113.6	172.2	361.4
47	49.3	57.6	69.3	86.8	116.4	176.7	373.0
48	50.4	58.9	70.8	88.8	119.2	181.2	384.9

小孔阳性孔 穴数	大孔阳性孔穴数						
	0	1	2	3	4	5	6
49	51.5	60.2	72.4	90.9	122.0	185.8	397.1
50	52.6	61.5	74.0	92.9	124.8	190.4	409.6
51	53.8	62.8	75.6	94.9	127.6	195.1	422.3
52	54.9	64.1	77.2	97.0	130.5	199.7	435.5
53	56.0	65.5	78.8	99.1	133.4	204.5	448.9
54	57.1	66.8	80.4	101.1	136.2	209.3	462.8
55	58.2	68.1	82.1	103.2	139.2	214.1	477.0
56	59.3	69.4	83.7	105.3	142.1	218.9	491.6
57	60.5	70.8	85.3	107.4	145.0	223.9	506.7
58	61.6	72.1	86.9	109.5	148.0	228.8	522.3
59	62.7	73.4	88.6	111.6	150.9	233.8	538.3
60	63.9	74.8	90.2	113.7	153.9	238.9	554.9
61	65.0	76.1	91.9	115.9	156.9	244.0	572.0
62	66.1	77.5	93.5	118.0	160.0	249.2	589.7
63	67.3	78.8	95.2	120.1	163.0	254.4	608.1
64	68.4	80.2	96.8	122.3	166.1	259.7	627.1
65	69.6	81.5	98.5	124.5	169.2	265.0	646.9
66	70.7	82.9	100.2	126.6	172.3	270.4	667.6
67	71.9	84.3	101.9	128.8	175.4	275.9	689.0
68	73.0	85.6	103.6	131.0	178.5	281.4	711.5
69	74.2	87.0	105.3	133.2	181.7	287.0	735.0
70	75.3	88.4	107.0	135.4	184.9	292.6	759.6
71	76.5	89.8	108.7	137.7	188.1	298.3	785.5
72	77.7	91.2	110.4	139.9	191.3	304.0	812.8
73	78.8	92.6	112.1	142.1	194.5	309.9	841.7
74	80.0	93.9	113.8	144.4	197.8	315.8	872.3
75	81.2	95.3	115.5	146.7	201.1	321.7	904.9
76	82.3	96.7	117.3	148.9	204.4	327.8	939.8
77	83.5	98.2	119.0	151.2	207.7	333.9	977.2
78	84.7	99.6	120.8	153.5	211.0	340.0	1017.6
79	85.9	101.0	122.5	155.8	214.4	346.3	1061.6
80	87.1	102.4	124.3	158.1	217.8	352.6	1109.7
81	88.3	103.8	126.0	160.5	221.2	359.1	1162.9
82	89.5	105.2	127.8	162.8	224.6	365.6	1222.4
83	90.7	106.7	129.6	165.2	228.1	372.1	1289.8
84	91.9	108.1	131.4	167.5	231.6	378.8	1367.7
85	93.1	109.5	133.2	169.9	235.1	385.6	1459.8
86	94.3	111.0	135.0	172.3	238.6	392.4	1572.5
87	95.5	112.4	136.8	174.7	242.2	399.4	1717.8
88	96.7	113.9	138.6	177.1	245.8	406.4	1922.6
89	97.9	115.3	140.4	179.5	249.4	413.6	2272.6
90	99.1	116.8	142.2	181.9	253.0	420.8	>2272.6

附录 B
(资料性)
菌型确定

菌型确定按如下步骤进行：

- a) 用 75%酒精擦拭定量盘背面显褐色或者浊度大于空白对照的阳性孔穴处。
 - b) 用移液管尖端直接穿刺并吸取 10 μL 阳性菌液接种到 BCYE 平板上,在 36 $^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 的 CO_2 培养箱中培养 2 d~4 d。
 - c) 挑选白色、灰色、蓝色、紫色、深褐色、灰绿色或深红色,边缘整齐、表面光滑,呈典型毛玻璃状的菌落,同时接种 BCYE 和 BCYE-cys 平板。在 36 $^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 的 CO_2 培养箱中培养 2 d。
 - d) 用嗜肺军团菌诊断血清对在 BCYE 琼脂平板上生长而在 BCYE-cys 琼脂平板上不生长的嗜肺军团菌菌落进行血清分型。
-

《水中嗜肺军团菌检验方法 酶底物定
量法》
(标准送审稿) 编制说明

《水中嗜肺军团菌检验方法 酶底物定量法》

标准编制组

2021年8月

目录

1. 项目背景.....	- 1 -
1.1 任务来源.....	- 1 -
1.2 工作过程.....	- 1 -
1.3 协作单位.....	- 1 -
1.4 标准主要起草人及其分工.....	- 2 -
1.5 参加起草人及其分工.....	- 3 -
2 与有关现行法律、法规和强制性国家标准的关系.....	- 4 -
3 确定各项技术内容（如技术指标、参数、公式、试验方法、检验规则等）的依据.....	- 4 -
4 标准制订的必要性.....	- 4 -
4.1 军团菌的危害.....	- 4 -
4.2 国内外环境水体中嗜肺军团菌的污染现状.....	- 5 -
4.3 监督检验及污染事故处理工作的需要.....	- 6 -
5 国内外水中嗜肺军团菌检验方法的相关研究.....	- 7 -
5.1 国内外嗜肺军团菌检验及评价方法现况.....	- 7 -
5.2 水中嗜肺军团菌酶底物检验法的性能研究及应用.....	- 9 -
6 标准制订的基本原则和技术路线.....	- 12 -
6.1 标准制订的基本原则.....	- 12 -
6.2 标准的适用范围和主要技术内容.....	- 13 -
6.3 标准制订的技术路线.....	- 13 -
7 方法研究报告.....	- 14 -
7.1 技术路线.....	- 14 -
7.2 方法原理.....	- 14 -
7.3 试剂和材料.....	- 15 -
7.4 仪器和设备.....	- 18 -
7.5 样品采集.....	- 18 -
7.6 分析步骤.....	- 19 -
7.7 质量控制.....	- 34 -
7.8 生物安全.....	- 35 -
8 方法验证单位相关信息.....	- 35 -
8.1 参加方法验证实验室的基本情况.....	- 35 -
8.2 参加方法验证人员的基本情况.....	- 36 -
9 重大意见分歧的处理经过和依据.....	- 37 -
10 对实施本标准的建议.....	- 37 -
参考文献:	- 39 -

张雅捷



《水中嗜肺军团菌检验方法 酶底物定量法》

（标准送审稿）编制说明

1. 项目背景

1.1 任务来源

根据中华预防医学会公布的关于 2019 年度团体标准立项征集工作(预会发〔2019〕76 号)的精神,北京市疾病预防控制中心环境卫生所成立编制组,开展《水中嗜肺军团菌检验方法 酶底物定量法》标准制定工作。

1.2 工作过程

北京市疾病预防控制中心环境卫生所在收到编制任务后,立即组建标准起草编制小组,制定标准编制计划,依据编制计划合理分工,深入开展论证工作。综合查阅国内外相关标准、文献,制定技术路线和实验方案,在此基础上开展标准编制工作。本标准研究期间,选择了不同来源,不同类型的多种水样进行实际样品的定性和定量研究,完成了实验室内验证工作。在此基础上,联合北京市内外多家有资质的实验室完成方法的实验室间验证工作。通过对上述实验数据的合理分析,最终完成本标准(标准送审稿)的编制。

1.3 协作单位

序号	单位名称
1	中国疾病预防控制中心环境与健康相关产品安全所
2	北京市朝阳区疾病预防控制中心
3	北京市延庆区疾病预防控制中心
4	北京市门头沟区疾病预防控制中心
5	山东省泰安市疾病预防控制中心
6	湖北省十堰市疾病预防控制中心

1.4 标准主要起草人及其分工

张雅婕，北京市疾病预防控制中心环境卫生所，副主任技师。负责本标准检验方法的技术路线、技术指标的提出及标准制订各阶段质控、内容核定工作，负责起草标准版本、征求意见稿、送审稿、报批稿的制订和标准解读、编制说明等工作，为本项目负责人。

牛春燕：北京市疾病预防控制中心环境卫生所，主管技师。负责本标准所有的数据录入、核对和统计处理工作，负责起草标准版本、征求意见稿、送审稿、报批稿的制订和标准解读、编制说明等工作。

李霞：中国疾病预防控制中心，研究员。参加方法技术指标的确定及讨论修改标准草案。

任淑敏：北京市延庆区疾病预防控制中心，主管技师。参加方法技术指标的确定及方法验证。

张新峰：山东省泰安市疾病预防控制中心，副主任技师。参加方法验证。

高艳：北京市朝阳区疾病预防控制中心，主任技师。参加方法技术指标的确定及方法验证。

张永：北京市疾病预防控制中心环境卫生所，主任医师。参加方法技术指标的确定及讨论修改标准草案。

张锐：北京市疾病预防控制中心环境卫生所，高级工程师。参加方法技术指标的确定及讨论修改标准草案。

刘海涛：北京市门头沟区疾病预防控制中心，副主任技师。参加方法验证。

杨康：湖北省十堰市疾病预防控制中心，主管技师。参加方法验证。

苏健：北京市门头沟区疾病预防控制中心，主管技师。参加方法验证。

张淑：北京市朝阳区疾病预防控制中心，技师。参加方法验证。

1.5 参加起草人及其分工

刘艳妍：北京市延庆区疾病预防控制中心，技师。参加方法验证。

赵璐：北京市延庆区疾病预防控制中心，技师。参加方法验证。

王健：北京市延庆区疾病预防控制中心，技师。参加方法验证。

刘凡：北京市延庆区疾病预防控制中心，技师。参加方法验证。

王长勇：山东省泰安市疾病预防控制中心，主管技师。参加方法验证。

张洋洋：山东省泰安市疾病预防控制中心，技师。参加方法验证。

张博文：北京市门头沟区疾病预防控制中心，技师。参加方法验证。

吕秋艳：北京市门头沟区疾病预防控制中心，副主任技师。参加方法验证。

李艳丽：湖北省十堰市疾病预防控制中心，主管技师。参加方法验证。

刘兰芳：湖北省十堰市疾病预防控制中心，主管技师。参加方法验证。

杨艳：湖北省十堰市疾病预防控制中心，主管技师。参加方法验证。

证。

高斌：北京市疾病预防控制中心环境卫生所，主管技师，负责部分采样及检验工作。

何立伟：北京市疾病预防控制中心环境卫生所，主管医师，负责部分采样工作。

2 与有关现行法律、法规和强制性国家标准的关系

本标准可作为国家标准《GB 37488-2019 公共场所卫生指标与限值要求》的配套标准和国家标准《GB/T 18204.5-2013 公共场所卫生检验方法 第5部分：集中空调通风系统》的补充检验方法。

3 确定各项技术内容（如技术指标、参数、公式、试验方法、检验规则等）的依据

本标准参照 SN/T 3266-2012、GB/T 18204.5-2013 和 ISO 11731-2017 进行了适用性、干扰因素、标准曲线、灵敏度、特异性、定量限、精密度和准确度等技术指标的确定。

4 标准制订的必要性

4.1 军团菌的危害

军团菌病是一种细菌性疾病，主要表现为军团菌肺炎、肺外综合征和庞蒂亚克热。其中军团菌引发的一种以肺炎为主的急性呼吸系统传染病，其特征是严重的呼吸道症状，具有高度致命性。军团菌肺炎是非典型肺炎中病情最重的一种，其病死率高达 15%~30%，免疫力

低下的患者可高达 80%，未经有效治疗的病死率高达 45%。该病已经被列为近几十年新发传染病之一，严重地威胁到人们的生命健康，已成为现代城市面临的一个重要公共卫生问题。

据相关研究显示，约 90%以上军团菌病是由嗜肺军团菌引起的，军团菌可在 25℃~45℃的温水中生长，广泛存在于人工、自然水环境、具有复杂水管系统的建筑物以及各种人工供水设施中，比如冷却塔、建筑用水、旋涡水疗和装饰性喷泉等^[1]，因此环境卫生将军团菌病的主要致病菌——嗜肺军团菌列为集中空调通风系统的常规监测项目之一。

4.2 国内外环境水体中嗜肺军团菌的污染现状

相关文献显示，空调系统、喷泉水、旋流池水和冷热水管道等人工水环境中的水温高、管道阻塞、水流停滞、铁锈、生物膜等因素为军团菌提供了良好的栖息和繁殖环境，导致这些水体中军团菌检出率较高。尤其是空调冷却水是引发军团菌病的最主要污染源。人们可通过吸入军团菌气溶胶而感染^[2]。

早在 20 世纪 80 年代英国和日本就报道了集中空调系统军团菌阳性率分别为 52.0%和 44.1%。在澳大利亚南部的阿德莱德，Deanna Hayes-Phillips 等人^[3]对家用热水淋浴系统进行了调查，研究结果显示军团菌和嗜肺军团菌的检出率分别为 74.6%(50/68)和 64.2%(43/68)。LEGNANI 等人^[4]检验了意大利某地 11 家私人保健院的供水系统，发现嗜肺军团菌检出率高达 86.8%。Rama Chaudhry 等人^[5]从印度一所医院和医疗中心的一般区域收集了 79 份水样（41 份饮用水，38 份非

饮用水），实验结果显示其中 28 份水样检出嗜肺军团菌。

国内针对水体中嗜肺军团菌的污染现状研究也有很多。郭宝羨等人^[6]在 2016~2017 年随机抽取漳州市公共场所沐浴用水 160 件，检出嗜肺军团菌阳性 72 件，检出率为 45.00%（72/160）。徐俊等人^[7]在 2017 年对北京市西城区公共淋浴场所 130 份样本进行分析，检出嗜肺军团菌阳性 28 件，总体阳性率为 21.5%。牟敬锋等人^[8]于 2015~2016 年共采集深圳市公共场所喷泉水 100 份，其中有 42 份水样检出嗜肺军团菌，检出率为 42.00%。肖光文等人^[9]于 2019 年 6~8 月期间随机选取了梅州城区部分医院、商场、酒店和学校作为研究对象，对其空调冷却水、沐浴用水、自来水和内外部景观水嗜肺军团菌污染状态进行了分析。结果显示 200 份空调冷却水中，共检出嗜肺军团菌 76 株（38.00%）；200 份自来水中，共检出嗜肺军团菌 35 株（17.50%）；200 份景观水中，共检出嗜肺军团菌 24 株（12.00%）；150 份沐浴用水中，共检出嗜肺军团菌 31 株（20.67%）。

综上所述，世界各地公共场所的人工水体中嗜肺军团菌的污染具有普遍性且状况严重，直接导致了许许多国家和地区军团菌病的散发或暴发。因此不仅需要从业人员在开展相关工作时定期做好消毒工作和个人防护，同时应提高相关卫生部门的认识，并制定相关标准及有效措施以降低嗜肺军团菌的污染水平。

4.3 监督检验及污染事故处理工作的需要

随着经济的飞速发展，我国承担的国际赛事、会议和演出等活动也越来越多。这给我国的重大活动卫生保障工作、日常卫生监督与检

验工作都提出了更高的要求，我们不仅要确保这些体育场馆、宾馆饭店和娱乐场所等公共场所的卫生状况符合我国国家标准或国际标准的要求；还要在发生污染事故时，能够在最短的时间内快速、准确地完成大样本量的检验，并对污染菌株进行进一步的分析研究，完成污染溯源工作。目前我国《GB 37488-2019 公共场所卫生指标与限值要求》对集中空调通风系统的冷却水和冷凝水以及沐浴用水规定不得检出嗜肺军团菌。然而与之相配套的 GB/T 18204.5-2013 检验方法步骤复杂、检验时间长，需要较多的试验耗材，质量控制的环节众多，最重要的是结果判断难度高，需要检验者具备丰富的经验。因此该方法不能满足快速、大规模的检验需求。所以，开发并引进快速、简单、准确的嗜肺军团菌检验方法势在必行。本研究介绍的酶底物法检验水中嗜肺军团菌的方法就是一种性能优越且操作简便的检验新方法，可很好地解决上述问题。该方法能将检验时间缩短到 7 天内完成，且不需要确认试验，对人员及环境污染较小，结果观察方便易行，检验准确度高，质控环节少，与国标方法相比能够更精确的指导对嗜肺军团菌的防控工作，符合环境工作发展的需要。

因此，为切实贯彻《中华人民共和国水污染防治法》，保护环境，保障人体健康，拟制定本标准。

5 国内外水中嗜肺军团菌检验方法的相关研究

5.1 国内外嗜肺军团菌检验及评价方法现况

作为防止军团菌病暴发流行的重要控制环节，许多国家和地区相继出台了水环境中嗜肺军团菌的监测方案^[10-14]。

国外现有的嗜肺军团菌评价标准有：瑞士制定了公共浴室和沐浴用水中军团菌评价标准 FSVO 2017；美国国家标准协会发布了 ASHRAE 188-2018，用来评估管理建筑水系统的军团菌病风险。国外现有的嗜肺军团菌检验标准有：ISO 11731-2017 采用培养法来检验水样；英国标准学会颁布的 BS 6068-4.12-1998 参考了 ISO 11731-2017 的方法测定水中的军团菌；法国标准化协会颁布的 NF T90-471-2010 中采用即时聚合酶链反应(RT-PCR)测定水中的军团菌和/或嗜肺军团菌；酶底物法定量检验嗜肺军团菌获得了法国标准协会（AFNOR）的 NF 验证认证，也获得了英国分析常务委员会(standing committee of analysis, SCA)的认可，并推荐该方法用于测定饮用水及其他检水类型中的嗜肺军团菌。

国内现有的嗜肺军团菌评价标准有《GB 37488-2019 公共场所卫生指标与限值要求》，此标准要求冷却水、冷凝水、沐浴用水中不得检出嗜肺军团菌，《T/ASC 02-2016 健康建筑评价标准》中规定集中生活热水系统不得检出嗜肺军团菌^[15]。国内现有的嗜肺军团菌检验标准有：《GB/T 18204.5-2013 公共场所卫生检验方法》、《DB 11/T 485-2020 集中空调通风系统卫生管理规范》附录 F、《SN/T 2528-2010 饮用水中军团菌检测》和《HG/T 4323-2012 循环冷却水中军团菌的检验与计数》均使用膜过滤法采集培养测定饮用水或者其他检水类型中的军团菌；《DB 11/T 485-2020 集中空调通风系统卫生管理规范》

附录 G 采用胶体金免疫层析法测定冷却水中嗜肺军团菌血清 1 型 (LP1)；《SN/T 2770-2011 国境口岸军团菌荧光 PCR 检验方法》中规定，使用荧光 PCR 技术测定临床标本或者环境样本如集中空调通风系统冷却水、冷凝水和管道饮用水中的军团菌。

5.2 水中嗜肺军团菌酶底物检验法的性能研究及应用

总的来说，国内外现行国家或者行业标准中使用的嗜肺军团菌检验方法基本相同，大多数检验方法是通过对集中空调冷凝水、冷却水等水环境样品进行过滤、洗脱、酸处理、热处理后再进行细菌培养^[16-17]。该方法需要的仪器和耗材种类繁多，流程复杂，检验时间长，灵敏度低，影响到军团菌的风险评估工作。近年来出现了一些新的嗜肺军团菌定量检验方法，包括 PCR 定量方法和酶底物法。其中，酶底物法是嗜肺军团菌利用培养基中丰富的氨基酸、维生素和其他营养素，迅速生长，经分解代谢作用，与培养基中的酶底物发生反应，使溶液浑浊或显褐色，以此指示样品是否存在嗜肺军团菌污染及其污染程度。近年来，有多个国家的研究人员通过对比酶底物法和传统过滤培养法对水中嗜肺军团菌的检验结果，来确定酶底物定量法的方法性能及适用性。如 D.P.Sartory 等人^[18]应用酶底物法检验饮用水和相关水样中的嗜肺军团菌发现：与 ISO 11731-2017 相比较，酶底物法显示出对嗜肺军团菌的高敏感性和高特异性，并且该方法显著改善和简化了饮用水相关样品中嗜肺军团菌的检验。在最近的另一项研究中，PETRISEK R 等人^[19]将酶底物法和美国公共卫生协会发表的水和废水标准检验方法 9260J 进行了比较，发现酶底物法对饮用水中嗜肺军

团菌的敏感性增加，对非饮用水的检验灵敏度和 9260J 方法相同。

Melaine M.Rech 等人^[20]用酶底物法和美国 CDC 提供的标准检验方法检验非饮用水中的嗜肺军团菌，研究结果显示酶底物法具有更高的灵敏度和特异性。Javier Checa 等人^[21]应用酶底物法与 ISO 11731-1998 法检验饮用水和非饮用水样品中的嗜肺军团菌，比较结果发现酶底物法具有很高的特异性，对嗜肺军团菌有更高的灵敏度和选择性，与此同时，鉴于酶底物法在检验程序上的优势，它还可以使得实验室更好的节省资源、成本和时间。总之，作者认为酶底物法可替代 ISO 11731: 1998。Silvia N. Monteiro 等人^[22]用酶底物法、传统过滤培养法（ISO 11731）和 qPCR 法对饮用水和非饮用水中嗜肺军团菌的检验进行了比较，同样证明酶底物法具有更高的特异性和便捷性，这代表了饮用水和非饮用水中嗜肺军团菌定量检验法的一个重大进展。另外，Kirsten Spies 等人^[23]对酶底物法和 ISO 11731 测定饮用水中嗜肺军团菌的研究也得到了相似的结论：酶底物法的特异性可达 97.9%，高于 ISO 11731 方法的特异性（95.3%）。同时，酶底物法在饮用水样品中测定的嗜肺军团菌浓度普遍高于 ISO 11731 方法的测定值，这也说明酶底物法有更好的灵敏度。在国内的相关研究中，付喜梅^[24]和陈智^[25]等人分别以四川省和武汉市部分集中空调通风系统冷却塔水中的嗜肺军团菌为研究对象，进行了酶底物法和分离培养法的比较，两者的研究结果均表明：酶底物法的检验时间短、操作简便，且该方法的检出率高于分离培养法。表 1 对近些年世界各地水环境样品中嗜肺

军团菌检验方法的原理进行了总结^[18-28]。表 2 对水中嗜肺军团菌的酶底物检验法和传统过滤培养法的性能研究及比对结果进行了总结。

表 1 世界各地水环境样品中嗜肺军团菌检验方法原理一览表

地区或组织	样品种类	检验原理
中国上海	医院建筑内水样	培养法
中国广州	宾馆沐浴用水	培养法
中国上海	公共建筑住宅	分子生物学技术 (qPCR)
美国	建筑水箱	分子生物学技术 (qPCR)
意大利	住宅	培养法
德国	小型住宅热水	培养法
国际标准化组织	水样	培养法
美国 CDC	饮用水和非饮用水	培养法
中国湖南	公共场所水环境	分子生物学技术 (RT-qPCR)
中国	公共场所非饮用水	培养法
中国	冷却水	胶体金免疫层析法
德国	饮用水	酶底物法
美国	饮用水和非饮用水	酶底物法
美国	非饮用水	酶底物法
加拿大魁北克	非饮用水	酶底物法
SCA	饮用水和非饮用水	酶底物法
西班牙	饮用水和非饮用水	酶底物法
葡萄牙	饮用水和非饮用水	酶底物法
德国	饮用水和非饮用水	酶底物法
中国四川	冷却水	酶底物法
中国武汉	冷却水	酶底物法

表 2 水中嗜肺军团菌的酶底物检验法和传统过滤培养法的性能研究及比对结果

地区或组织	发表杂志及时间	结果
德国	Letters in Applied Microbiology; 2017	酶底物法检验饮用水中的嗜肺军团菌的特异性为 96.4%。
美国	Journal of Water & Health; 2017	酶底物法检验饮用水和非饮用水中的嗜肺军团菌的特异性均为 100%。
美国	Current Microbiology; 2018	酶底物法的灵敏度为 0.84 ± 0.08 , 特异性为 0.97 ± 0.02 , 证明酶底物法具有较高的灵敏度和特异性, 并且对非饮用水中的非军团菌有更好的抗干扰能力。
加拿大魁北克	Journal of AOAC INTERNATIONAL; 2019	酶底物法具有更广的检验范围 (1 - 2273 MPN), 不需要过多的前处理步骤, 对冷却塔水中的嗜肺军团菌有较高的灵敏性, 且试验结果易于判读和读取。

SCA	英国标准分析协会文件； 2020	和传统的 GVPC 琼脂培养法相比，酶底物法对于嗜肺军团菌的分离具有相同或者更好的表现；酶底物法对嗜肺军团菌具有很好的特异性，所以不需要做进一步的阳性孔穴验证实验。
西班牙	Journal of Microbiological Methods; 2021	对同一样本的测定，酶底物法的检出浓度高于 ISO 11731；酶底物法具有更高的敏感性和选择性，方法的特异性为 100%。
葡萄牙	Current Microbiology; 2021	对同一样本的测定，酶底物法的检出浓度高于 ISO 11731；酶底物法对水中嗜肺军团菌的检出率高于 ISO 11731；酶底物法具有更好的特异性且操作步骤简便。
德国	International Journal of Hygiene and Environmental Health; 2018	酶底物法的特异性(97.9%)高于 ISO 11731 (95.3%)。
中国四川	生物化工；2020	酶底物法检验时间短、操作简单，最低检出浓度为 3.9 MPN/100mL，说明酶底物法的灵敏度较高。
中国武汉	环境与健康杂志；2020	酶底物法对水中嗜肺军团菌的检出率（83.04%）高于分离培养法（73.21%）；酶底物法操作简单方便，人为误差小。

6 标准制订的基本原则和技术路线

6.1 标准制订的基本原则

6.1.1 本方法定量限和测定范围满足公共场所嗜肺军团菌检验工作的要求；

6.1.2 本方法准确可靠、满足各项方法特性指标的要求；

6.1.3 本方法具有普遍适用性，易于推广使用。

6.1.4 按照《水质 微生物方法确认指南》ISO/TR 13843-2000、《标准化工作导则 第一部分：标准的结构和编写》GB/T 1.1-2009、《食品微生物检验方法确认技术规范》SN/T 3266-2012、《测量方法与结果的准确度（正确度与精密度）》GB/T 6379-2004/ISO 5725-2-1994、

《统计学词汇及符号》GB/T 3358.2-2009/ISO 3534-2-2006 等文件的要求进行标准编制。

6.2 标准的适用范围和主要技术内容

6.2.1 适用范围

本标准适用于冷却水、冷凝水和沐浴用水中嗜肺军团菌的检验。其他水质检验可参考本法进行。

6.2.2 主要技术内容

本标准采用酶底物法与 GB/T 18204.5-2013 及 ISO 11731-2017 推荐的过滤培养法进行比对研究，确定酶底物法的技术指标并完善质量控制和质量保证手段。

6.3 标准制订的技术路线

6.3.1 本标准采用酶底物法测定水中嗜肺军团菌，选择不同类型不同地区的水样与过滤培养法进行比对研究，确定该方法的性能及适用性。

6.3.2 购买有证标准菌株与质控样品，进行阴、阳性对照实验和准确性实验。

6.3.3 干扰因素确定实验：样品保存的影响因素分析和包容性及排他性试验。

6.3.4 进行 5 家实验室准确度和精密度的验证试验。

6.3.5 编制标准文本征求意见稿和编制说明。

6.3.6 对征求的意见进行汇总，编制标准文本的送审稿和编制说明。

6.3.7 送审稿经审查合格后，提交标准文本的报批稿和编制说明。

6.3.8 报批稿经审查后，标准发布。

7 方法研究报告

7.1 技术路线

酶底物法完成水中嗜肺军团菌的定量研究的技术路线见图 1。

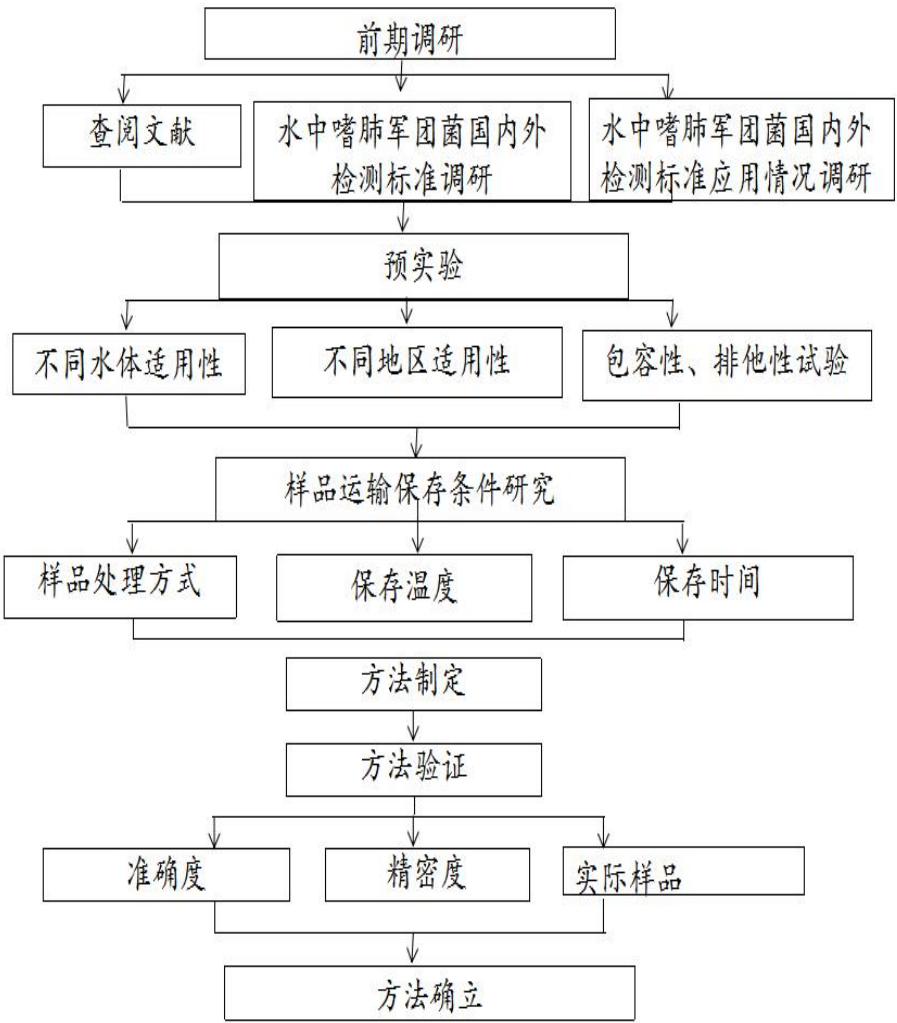


图 1 技术路线图

7.2 方法原理

酶底物检验法是基于一种细菌酶的检验技术。即嗜肺军团菌利用

培养基中丰富的氨基酸、维生素和其他营养物质迅速地生长，经分解代谢作用，与培养基中的酶底物发生反应使溶液浑浊或显褐色。7 天内酶底物检验法可定量检验的嗜肺军团菌最低浓度为 1 MPN/100 mL。

7.3 试剂和材料

7.3.1 酶底物法培养基

7.3.1.1 成分

N-氨基甲酰甲基乙磺酸缓冲液（ACES）	10.0 g
酵母膏	3.5 g
硫酸镁	0.35 g
α -酮戊二酸	1.05 g
丙酮酸钠	0.45 g
氨基酸	4.7 g
硫代硫酸钠	0.007 g
二氯化锰	0.03 g
抗生素	0.35 g

7.3.1.2 制法

将以上成分按比例溶解在 1000 mL 无菌水中，121℃，高压灭菌 15 min。

7.3.2 预处理液的配制

称取 2.04 g 雷伯环衍生物有机酸加入 100 mL 无菌水中混匀。

7.3.3 硫代硫酸钠溶液的配制

称取 26 g 硫代硫酸钠 ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) (或 16 g 无水硫代硫酸钠), 溶于 1 L 水中, 并加热煮沸 10 min, 冷却, 过滤后避光备用。

7.3.4 菌种鉴定用培养基 BCYE

7.3.4.1 成分

ACES 缓冲液

(N-2-乙酰氨基-2-酰氨基乙烷磺酸)	10.0 g
氢氧化钾	2.8 g
活性炭	2.0 g
酵母提取物 (细菌级)	10.0 g
α -酮戊二酸钾盐	1.0 g
琼脂	12.0 g
L-半胱氨酸盐酸盐-水合物	0.4 g
焦磷酸铁 (III)	0.25 g
水	1000 mL

7.3.4.2 制法

7.3.4.2.1 将 0.4 g L-半胱氨酸盐酸盐-水合物加到 10 mL 水中。通过孔径为 0.22 μm 的膜过滤器过滤, 对溶液进行过滤灭菌。

7.3.4.2.2 将 0.25 g 焦磷酸铁 (III) 加到 10 mL 水中。通过孔径为 0.22 μm 的膜过滤器过滤, 对溶液进行过滤灭菌。

7.3.4.2.3 将 10 g N-2-乙酰氨基-2-酰氨基乙烷磺酸 (ACES) 缓冲液添加到含 500 mL 水的容器中, 于 45℃~50℃ 的水浴中溶解。用 0.1 mol/L 氢氧化钾溶液和 0.1 mol/L 硫酸溶液, 将 ACES 缓冲液的 pH 调至 6.8

±0.1。

7.3.4.2.4 将 2.8 g 氢氧化钾添加到 480 mL 水中,并轻轻摇动使其溶解。

7.3.4.2.5 混合 7.3.4.2.3 和 7.3.4.2.4 中的两种溶液,并依次添加 2 g 活性炭、10 g 酵母提取物和 1 g α -酮戊二酸钾盐,每次添加之间要充分混合。加入琼脂,充分混合并在 121℃ 高压灭菌 15 min 后,在水浴中冷却至 (50 ± 2) °C。

7.3.4.2.6 无菌添加 L-半胱氨酸 (7.3.4.2.1) 和焦磷酸铁 (III) 溶液 (7.3.4.2.2),每次添加之前应充分混合。在 25 °C 下培养基的 pH 应为 6.8 ± 0.2 。

7.3.5 BCYE-cys 培养基

该培养基应按照 7.3.4.2 进行制备,但不添加 L-半胱氨酸盐酸盐-水合物。

7.3.6 无菌水

使用符合三级水要求的实验用水,经 121 °C 高压灭菌 15min 备用。

7.3.7 标准菌株

7.3.7.1 阳性对照标准菌株:嗜肺军团菌 Lp1 (CICC24883/ATCC 33152 或其他同类菌株)。

7.3.7.2 阴性对照标准菌株:粪肠球菌 (CICC10396/ATCC 29212 或其他同类菌株)。

7.3.7.3 包容性试验用菌株:标准菌株 Lp 1、嗜肺军团菌野毒株 Lp(2~3)、Lp(5~8)。

7.3.7.4 排他性实验用菌株：大肠埃希氏菌（CICC 23657）和粪肠球菌（ATCC 29212）

7.4 仪器和设备

7.4.1 高压蒸汽灭菌器：121℃（0.10 MPa~0.12 MPa）。

7.4.2 干热灭菌器（烤箱）：60℃~80℃、160℃~180℃。

7.4.3 生化培养箱或恒温恒湿培养箱：36℃±1℃。

7.4.4 CO₂ 培养箱：CO₂ 浓度为 2.5%、36℃±1℃。

7.4.5 三角瓶：带盖的无菌玻璃瓶或者聚乙烯瓶。

7.4.6 采样瓶（含硫代硫酸钠）：含 0.1 mol/L 硫代硫酸钠（Na₂S₂O₃）的无菌广口玻璃瓶或聚乙烯瓶。

7.4.7 程控定量封口机。

7.4.8 定量盘：定量培养用无菌塑料盘，含 96 个孔穴，其中 6 个大孔（13.7 mL/大孔），90 个小孔（0.2 mL/小孔）。

7.4.9 定量盘橡胶衬垫：与 96 孔定量盘配套使用。

7.4.10 吸管：1 mL、10 mL 的无菌玻璃吸管或可调式移液管。

7.4.11 试管：5 mL 或 10 mL 无菌带盖玻璃试管或者离心管。

7.4.12 量筒：100 mL±1 mL。

7.4.13 生物安全柜。

7.5 样品采集

7.5.1 采样瓶的准备与灭菌

采样瓶准备时应添加硫代硫酸钠溶液（7.3.3）消除活性氯对嗜肺军团菌的干扰。

将浓度为0.1 mol/L硫代硫酸钠溶液与拟采集水样体积按照1:1000的比例加入采样广口玻璃瓶中，于160℃～180℃干热灭菌2 h，或用高压蒸汽灭菌器，121℃高压灭菌15 min。干热灭菌的采样瓶应在两周内使用；湿热灭菌的采样瓶如不能立即使用，应于60℃烤箱内将瓶内冷凝水烘干，两周内使用。

7.5.2 样品采集

按照 GB/T 18204.5 的要求采集冷却水和冷凝水，冷却水样品采集应在距冷却塔壁 20 cm、液面下 10 cm 处，冷凝水样品采集应在排水管或冷凝水盘处；按照 GB/T 18204.6 的要求采集沐浴用水，沐浴用水样品采集应随机选择 5 个沐浴喷头；在沐浴池选择 3 个采样点，采集水面下 30 cm 处水样。每个采样点依无菌操作取样 500 mL。

7.5.3 样品运输与保存

样品应在常温条件下避光保存，并在 48 h 内送往实验室开展检验。

7.6 分析步骤

7.6.1 样品检验步骤

7.6.1.1 稀释

根据对样品污染状况的估计，将样品稀释至可计数浓度范围。

稀释方法：以无菌操作方法吸取10 mL充分混匀的水样，加入到含有90 mL无菌水的三角瓶中，混匀成1:10的稀释液，按照同法递增稀释，每稀释一个浓度梯度，更换一支10 mL吸管。

7.6.1.2 接种

7.6.1.2.1 取100 mL配制好的酶底物法培养基到无菌三角瓶中备用。

7.6.1.2.2 取2 mL预处理液到无菌试管中。

7.6.1.2.3 将2 mL的水样原液和/或稀释液加到含有2 mL预处理液的试管中，混匀，于常温静置（ 60 ± 5 ）s，静置结束前再次混匀试管内液体，并立即取2 mL加到100 mL酶底物法培养基（7.6.1.2.1）中混匀。

7.6.1.2.4 将7.6.1.2.3三角瓶中的液体全部加到96孔定量盘中，以手抚平96孔定量盘背面，赶除孔内气泡，然后用程控定量封口机封口。观察96孔定量盘颜色，若出现与阳性对照相同的颜色，应终止试验或重新操作。

7.6.1.3 培养

将96孔定量盘纸面向下放置于 $36^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 的培养箱中培养7d，且培养箱中水盘避免干涸。

7.6.2 对照试验

7.6.2.1 空白对照

制备1个100 mL无菌水样品，按照7.6.1.2和7.6.1.3中步骤进行操作。培养后的96孔定量盘应无任何颜色或浊度变化。

7.6.2.2 阴性对照

制备1个（ $10^3\sim 10^4$ ）CFU/mL的100 mL粪肠球菌菌悬液，按照7.6.1.2和7.6.1.3中步骤进行操作。培养后的96孔定量盘应无任何颜色或浊度变化。

7.6.2.3 阳性对照

制备 1 个 ($10^2 \sim 10^3$) CFU/mL 的 100 mL 嗜肺军团菌菌悬液，按照 7.6.1.2 和 7.6.1.3 中步骤进行操作。培养后的 96 孔定量盘应显褐色或浊度大于空白对照。

7.6.3 检验结果

7.6.3.1 未检出

将培养 7d 后的定量盘取出观察。如果所有孔穴内水样的颜色与浊度和空白对照无差异（见表 3 及图 2A），可直接报告结果。结果报告为“未检出/100 mL”。

7.6.3.2 检出

如果孔穴内的水样显褐色或者浊度大于空白对照则表示该孔穴中含有嗜肺军团菌（见表 3 及图 2B）。记录所有显褐色或有浊度变化的孔穴数量，对照 96 孔定量盘 MPN 表（表 4）查出其代表的嗜肺军团菌最可能数（MPN），并按照公式（1）进行嗜肺军团菌浓度计算，结果报告采用两位有效数字的科学计数法表示，单位为 MPN/100 mL。

表 3 结果判读表

外观	嗜肺军团菌结果
相对空白对照而言，无论浑浊与否，任何显褐色的迹象	阳性
相对空白对照而言，无论是否显褐色，浊度大于阴性对照	阳性
如颜色与浊度方面，与阴性对照无差异	阴性



图 2A 酶底物法阴性结果对照图 图 2B 酶底物法阳性结果对照图

注：96 孔定量孔板的培养时间为 7d。在 7d 培养内出现的阳性结果和 7d 后显示的阴性检验结果均有效。

表 4 96 孔定量盘 MPN 表

小孔阳性孔 穴数	大孔阳性孔穴数						
	0	1	2	3	4	5	6
0	<1	1.1	2.3	3.9	5.8	8.4	12.6
1	1.0	2.2	3.5	5.2	7.4	10.4	15.5
2	2.0	3.2	4.7	6.6	9.0	12.4	18.7
3	3.0	4.3	5.9	7.9	10.6	14.6	22.3
4	4.0	5.4	7.2	9.4	12.3	16.9	26.4
5	5.0	6.5	8.4	10.8	14.1	19.4	31.0
6	6.0	7.7	9.7	12.3	15.9	21.9	36.1
7	7.0	8.8	10.9	13.8	17.8	24.6	41.6
8	8.1	9.9	12.2	15.3	19.8	27.5	47.4
9	9.1	11.0	13.5	16.8	21.7	30.5	53.4
10	10.1	12.2	14.8	18.4	23.8	33.5	59.6
11	11.1	13.3	16.1	20.0	25.9	36.7	65.9
12	12.1	14.5	17.5	21.6	28.0	40.0	72.3
13	13.2	15.6	18.8	23.3	30.2	43.3	78.8
14	14.2	16.8	20.2	24.9	32.4	46.7	85.4
15	15.2	18.0	21.5	26.6	34.7	50.1	92.1
16	16.3	19.1	22.9	28.3	37.0	53.6	98.9

17	17.3	20.3	24.3	30.1	39.3	57.1	105.7
18	18.3	21.5	25.7	31.8	41.6	60.6	112.7
19	19.4	22.7	27.1	33.6	44.0	64.2	119.8
20	20.4	23.9	28.5	35.3	46.4	67.8	126.9
21	21.4	25.1	30.0	37.1	48.8	71.5	134.2
22	22.5	26.3	31.4	38.9	51.2	75.1	141.6
23	23.5	27.5	32.9	40.7	53.7	78.8	149.0
24	24.6	28.7	34.3	42.6	56.1	82.5	156.6
25	25.6	29.9	35.8	44.4	58.6	86.3	164.4
26	26.7	31.1	37.2	46.2	61.1	90.1	172.2
27	27.7	32.4	38.7	48.1	63.6	93.9	180.1
28	28.8	33.6	40.2	49.9	66.1	97.7	188.2
29	29.9	34.8	41.7	51.8	68.6	101.6	196.4
30	30.9	36.1	43.1	53.7	71.1	105.5	204.8
31	32.0	37.3	44.6	55.6	73.7	109.4	213.3
32	33.1	38.5	46.1	57.5	76.2	113.3	221.9
33	34.1	39.8	47.6	59.4	78.8	117.3	230.7
34	35.2	41.0	49.2	61.3	81.4	121.3	239.6
35	36.3	42.3	50.7	63.2	84.0	125.4	248.7
36	37.3	43.5	52.2	65.1	86.6	129.5	258.0
37	38.4	44.8	53.7	67.1	89.3	133.6	267.4
38	39.5	46.1	55.3	69.0	91.9	137.7	277.1
39	40.6	47.3	56.8	71.0	94.6	141.9	286.9
40	41.7	48.6	58.3	72.9	97.2	146.1	296.9
41	42.8	49.9	59.9	74.9	99.9	150.4	307.1
42	43.8	51.2	61.4	76.8	102.6	154.7	317.5
43	44.9	52.5	63.0	78.8	105.4	159.0	328.1
44	46.0	53.7	64.5	80.8	108.1	163.4	339.0
45	47.1	55.0	66.1	82.8	110.8	167.8	350.1
46	48.2	56.3	67.7	84.8	113.6	172.2	361.4
47	49.3	57.6	69.3	86.8	116.4	176.7	373.0
48	50.4	58.9	70.8	88.8	119.2	181.2	384.9
49	51.5	60.2	72.4	90.9	122.0	185.8	397.1
50	52.6	61.5	74.0	92.9	124.8	190.4	409.6
51	53.8	62.8	75.6	94.9	127.6	195.1	422.3
52	54.9	64.1	77.2	97.0	130.5	199.7	435.5
53	56.0	65.5	78.8	99.1	133.4	204.5	448.9
54	57.1	66.8	80.4	101.1	136.2	209.3	462.8
55	58.2	68.1	82.1	103.2	139.2	214.1	477.0
56	59.3	69.4	83.7	105.3	142.1	218.9	491.6
57	60.5	70.8	85.3	107.4	145.0	223.9	506.7
58	61.6	72.1	86.9	109.5	148.0	228.8	522.3
59	62.7	73.4	88.6	111.6	150.9	233.8	538.3
60	63.9	74.8	90.2	113.7	153.9	238.9	554.9

61	65.0	76.1	91.9	115.9	156.9	244.0	572.0
62	66.1	77.5	93.5	118.0	160.0	249.2	589.7
63	67.3	78.8	95.2	120.1	163.0	254.4	608.1
64	68.4	80.2	96.8	122.3	166.1	259.7	627.1
65	69.6	81.5	98.5	124.5	169.2	265.0	646.9
66	70.7	82.9	100.2	126.6	172.3	270.4	667.6
67	71.9	84.3	101.9	128.8	175.4	275.9	689.0
68	73.0	85.6	103.6	131.0	178.5	281.4	711.5
69	74.2	87.0	105.3	133.2	181.7	287.0	735.0
70	75.3	88.4	107.0	135.4	184.9	292.6	759.6
71	76.5	89.8	108.7	137.7	188.1	298.3	785.5
72	77.7	91.2	110.4	139.9	191.3	304.0	812.8
73	78.8	92.6	112.1	142.1	194.5	309.9	841.7
74	80.0	93.9	113.8	144.4	197.8	315.8	872.3
75	81.2	95.3	115.5	146.7	201.1	321.7	904.9
76	82.3	96.7	117.3	148.9	204.4	327.8	939.8
77	83.5	98.2	119.0	151.2	207.7	333.9	977.2
78	84.7	99.6	120.8	153.5	211.0	340.0	1017.6
79	85.9	101.0	122.5	155.8	214.4	346.3	1061.6
80	87.1	102.4	124.3	158.1	217.8	352.6	1109.7
81	88.3	103.8	126.0	160.5	221.2	359.1	1162.9
82	89.5	105.2	127.8	162.8	224.6	365.6	1222.4
83	90.7	106.7	129.6	165.2	228.1	372.1	1289.8
84	91.9	108.1	131.4	167.5	231.6	378.8	1367.7
85	93.1	109.5	133.2	169.9	235.1	385.6	1459.8
86	94.3	111.0	135.0	172.3	238.6	392.4	1572.5
87	95.5	112.4	136.8	174.7	242.2	399.4	1717.8
88	96.7	113.9	138.6	177.1	245.8	406.4	1922.6
89	97.9	115.3	140.4	179.5	249.4	413.6	2272.6
90	99.1	116.8	142.2	181.9	253.0	420.8	>2272.6

公式:

$$C = MPN \text{ 值} \times 100 \times b \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中: c —— 嗜肺军团菌浓度, 单位为MPN/100 mL;

MPN值 —— 96孔定量盘阳性孔数查表所得结果;

b —— 接种样品的稀释倍数。

7.6.4 菌型确定

如需对嗜肺军团菌阳性结果进行菌型确定, 则按照以下步骤

进行操作：

7.6.4.1 用75%酒精擦拭定量盘背面显褐色或者浊度大于空白对照的阳性孔穴处。

7.6.4.2 用移液管尖端直接穿刺并吸取10 μ L阳性菌液接种到BCYE平板上，在 $36^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 的 CO_2 培养箱中培养2 d~4 d。

7.6.4.3 挑选白色、灰色、蓝色、紫色、深褐色、灰绿色或深红色，边缘整齐、表面光滑，呈典型毛玻璃状的菌落，同时接种BCYE和BCYE-cys平板。在 $36^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 的 CO_2 培养箱中培养2 d。

7.6.4.4 用嗜肺军团菌诊断血清对在BCYE琼脂平板上生长而在BCYE-cys琼脂平板上不生长的嗜肺军团菌菌落进行血清分型。

7.6.5 包容性及排他性试验

由于菌株购买受限，本研究只对以下几种菌株进行了相关研究。

7.6.5.1 包容性试验

本研究选用嗜肺军团菌 Lp(1~3)、Lp(5~8)分别配制成($10^2\sim 10^3$) CFU/mL 的不同血清型嗜肺军团菌菌悬液，按照 7.6.1 分别进行检验并按照 7.6.4 做菌型确定试验，上述血清型菌悬液的酶底物法 96 孔定量盘均有褐色孔穴呈现，即均能定量检出以上血清型的嗜肺军团菌。

7.6.5.2 排他性实验

本研究选用粪肠球菌和大肠埃希氏菌分别配制成两瓶 ($10^3\sim 10^4$) CFU/mL 的混悬液，按照 7.6.1 进行检验，酶底物法 96 孔定量盘均未出现浑浊或者颜色变化，即未检出嗜肺军团菌。

7.6.6 样品保存的影响因素分析

为进一步探索样品保存条件对检验结果的影响，本标准利用析因分析研究了不同保存条件下同一样品的检验值。保存条件包括：样品保存温度、保存时间以及不同处理方式（是否去除水中余氯）。采用 SPSS 统计软件对实验结果进行多因素方差分析，具体结果见表 5。结果显示“处理方式”对应的 $P=0.000<0.05$ ，即不同处理方式对嗜肺军团菌检验结果的影响具有统计学差异。而在时间、处理方式和温度三个因素间的 P 值均 >0.05 ，即各因素间彼此不存在交互效应。由图 3 可见，保存条件中是否去除余氯对检验结果的影响较大，并且去除余氯更有利于提高检出方法的灵敏度。

表 5 不同保存条件对检验结果的影响

源	III 型平方和	df	均方	F	Sig.
校正模型	29.710a	11	2.701	10.692	0.000
截距	153.217	1	153.217	606.553	0.000
时间	0.002	1	0.002	0.007	0.933
处理方式	28.306	1	28.306	112.055	0.000
温度	0.111	2	0.056	0.22	0.804
时间 * 处理方式	0.115	1	0.115	0.457	0.506
时间 * 温度	0.462	2	0.231	0.915	0.415
处理方式 * 温度	0.203	2	0.101	0.401	0.674
时间 * 处理方式 * 温度	0.488	2	0.244	0.966	0.395
误差	5.81	23	0.253		
总计	195.378	35			
校正的总计	35.52	34			

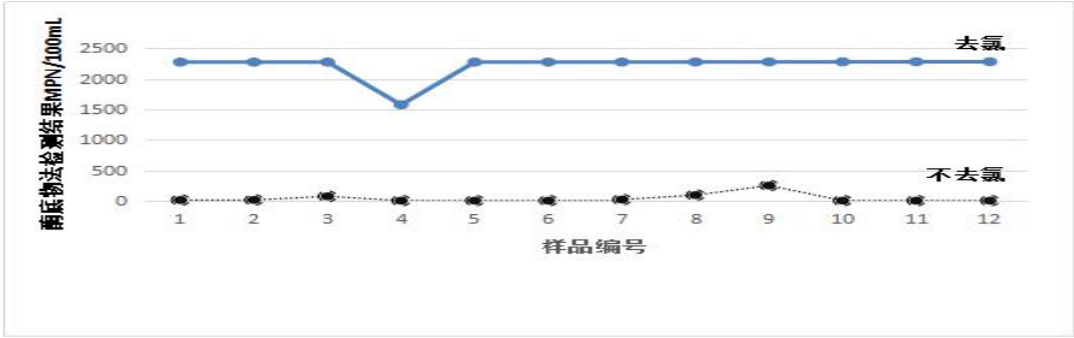


图 3 不同处理方式下酶底物法检验结果的比较

7.6.7 标准曲线的制备

依次量取 (96 ± 19) MPN/100 mL 的质控样品（爱德士开发公司，菌种编号 NCTC 11192，产品批号 200413）10 mL、5 mL、4 mL、3 mL、2 mL 至采样瓶中，使用无菌纯水准确定容至 100 mL，依次配制成 9.60，4.80，3.84，2.91，1.92 MPN/100 mL 的标准系列。以系列质控样品的浓度为横坐标，以酶底物法检出嗜肺军团菌的浓度为纵坐标进行线性回归，制作工作曲线和线性回归方程。结果见图 4。

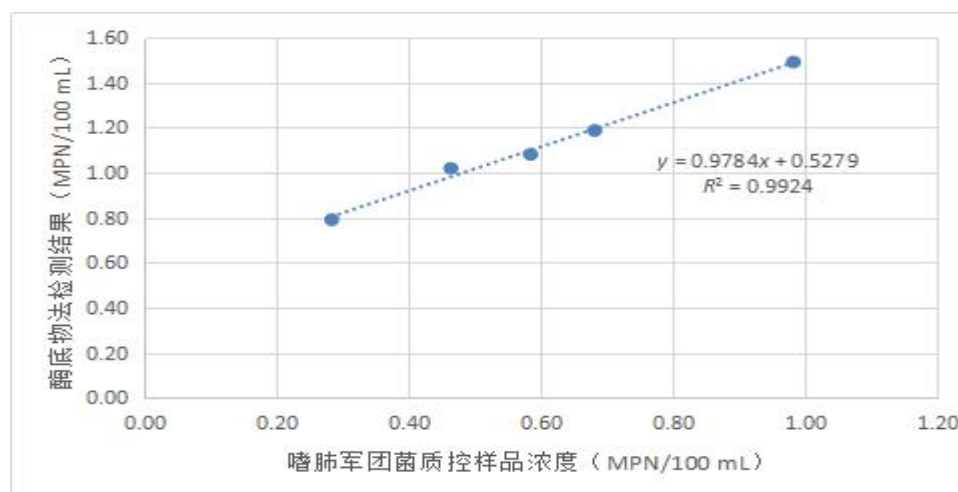


图 4 嗜肺军团菌质控样品标准曲线

7.6.8 精密度和准确度

7.6.8.1 精密度的测定

选取有证的标准菌株进行精密度实验，购买中国微生物菌种保藏管理中心研制的标准菌株，产品批号 20202028（菌种编号 CICC 24883），然后按照菌株说明书进行复苏和活化，配制成低中高三个浓度的加标水样，每个浓度水样平行测定6次。

7.6.8.2 准确度的测定

选取有证的质控样品进行准确度实验，购买爱德士开发公司研制的质控样品，产品号为33152（菌种编号NCTC 11192）产品批号

200413, 定量值范围 (96 ± 19) MPN/100 mL或 (425 ± 71) CFU/100 mL。测定方法按照菌株说明书进行复苏和活化, 对稀释一个梯度后的质控样品进行6次平行实验。

7.6.8.3 测定结果

各实验室结果见表6~表13。按照其统计分析要求, 检验所得MPN值应经对数(以10为底)转换后, 再进行精密度和准确度的统计分析。各实验室质控样的回收率在110.35%~114.96%之间, 精密度的RSD(%) 值在0.38%~6.13%之间。

表6 实验室1---北京市疾病预防控制中心检验结果

样品编号	检验结果 (MPN/100 mL)	样品编号	检验结果 (MPN/100 mL)	样品编号	检验结果 (MPN/100 mL)	样品编号	检验结果 (MPN/100 mL)
质控样-1	1.55×10^2	低浓度-1	5.80×10^2	中浓度-1	5.96×10^3	高浓度-1	6.47×10^4
质控样-2	1.55×10^2	低浓度-2	7.40×10^2	中浓度-2	7.23×10^3	高浓度-2	7.35×10^4
质控样-3	1.55×10^2	低浓度-3	6.60×10^2	中浓度-3	5.34×10^3	高浓度-3	6.89×10^4
质控样-4	1.46×10^2	低浓度-4	7.90×10^2	中浓度-4	7.88×10^3	高浓度-4	7.86×10^4
质控样-5	1.46×10^2	低浓度-5	6.60×10^2	中浓度-5	6.60×10^3	高浓度-5	7.60×10^4
质控样-6	1.69×10^2	低浓度-6	7.40×10^2	中浓度-6	7.23×10^3	高浓度-6	6.68×10^4
\bar{x}_i	1.54×10^2	\bar{x}_i	6.95×10^2	\bar{x}_i	6.71×10^3	\bar{x}_i	7.14×10^4
SD	0.02	SD	0.05	SD	0.06	SD	0.03
RSD(%)	1.07	RSD(%)	1.71	RSD(%)	1.63	RSD(%)	0.69

表7 实验室2---北京市延庆区疾病预防控制中心检验结果

样品编号	检验结果 (MPN/100 mL)	样品编号	检验结果 (MPN/100 mL)	样品编号	检验结果 (MPN/100 mL)	样品编号	检验结果 (MPN/100 mL)
质控样-1	1.69×10^2	低浓度-1	7.40×10^2	中浓度-1	4.74×10^3	高浓度-1	8.13×10^4
质控样-2	1.69×10^2	低浓度-2	5.20×10^2	中浓度-2	5.34×10^3	高浓度-2	7.60×10^4
质控样-3	1.69×10^2	低浓度-3	4.70×10^2	中浓度-3	7.88×10^3	高浓度-3	6.89×10^4
质控样-4	1.55×10^2	低浓度-4	3.50×10^2	中浓度-4	3.61×10^3	高浓度-4	6.47×10^4
质控样-5	1.69×10^2	低浓度-5	6.60×10^2	中浓度-5	5.34×10^3	高浓度-5	7.86×10^4
质控样-6	1.46×10^2	低浓度-6	4.70×10^2	中浓度-6	7.23×10^3	高浓度-6	7.35×10^4
\bar{x}_i	1.63×10^2	\bar{x}_i	5.35×10^2	\bar{x}_i	5.69×10^3	\bar{x}_i	7.38×10^4
SD	0.03	SD	0.12	SD	0.12	SD	0.04
RSD(%)	1.24	RSD(%)	4.28	RSD(%)	3.31	RSD(%)	0.76

表8 实验室3---北京市朝阳区疾病预防控制中心检验结果

样品编号	检验结果 (MPN/100 mL)	样品编号	检验结果 (MPN/100 mL)	样品编号	检验结果 (MPN/100 mL)	样品编号	检验结果 (MPN/100 mL)
质控样-1	1.46×10^2	低浓度-1	6.60×10^2	中浓度-1	7.88×10^3	高浓度-1	7.86×10^4
质控样-2	1.55×10^2	低浓度-2	5.90×10^2	中浓度-2	5.34×10^3	高浓度-2	7.60×10^4
质控样-3	1.55×10^2	低浓度-3	4.70×10^2	中浓度-3	7.88×10^3	高浓度-3	6.89×10^4
质控样-4	1.46×10^2	低浓度-4	5.90×10^2	中浓度-4	4.74×10^3	高浓度-4	6.47×10^4
质控样-5	1.69×10^2	低浓度-5	6.60×10^2	中浓度-5	5.34×10^3	高浓度-5	8.13×10^4
质控样-6	1.69×10^2	低浓度-6	4.70×10^2	中浓度-6	7.23×10^3	高浓度-6	7.35×10^4
\bar{x}_i	1.57×10^2	\bar{x}_i	5.73×10^2	\bar{x}_i	6.40×10^3	\bar{x}_i	7.38×10^4
<i>SD</i>	0.03	<i>SD</i>	0.07	<i>SD</i>	0.10	<i>SD</i>	0.04
<i>RSD</i> (%)	1.30	<i>RSD</i> (%)	2.44	<i>RSD</i> (%)	2.58	<i>RSD</i> (%)	0.76

表9 实验室4---山东省泰安市疾病预防控制中心检验结果

样品编号	检验结果 (MPN/100 mL)	样品编号	检验结果 (MPN/100 mL)	样品编号	检验结果 (MPN/100 mL)	样品编号	检验结果 (MPN/100mL)
质控样-1	1.87×10^2	低浓度-1	7.40×10^2	中浓度-1	5.34×10^3	高浓度-1	5.90×10^4
质控样-2	1.94×10^2	低浓度-2	5.80×10^2	中浓度-2	5.34×10^3	高浓度-2	5.38×10^4
质控样-3	1.87×10^2	低浓度-3	6.60×10^2	中浓度-3	4.74×10^3	高浓度-3	4.92×10^4
质控样-4	1.87×10^2	低浓度-4	5.80×10^2	中浓度-4	5.96×10^3	高浓度-4	6.89×10^4
质控样-5	1.94×10^2	低浓度-5	6.60×10^2	中浓度-5	5.96×10^3	高浓度-5	7.35×10^4
质控样-6	1.94×10^2	低浓度-6	3.90×10^2	中浓度-6	6.59×10^3	高浓度-6	7.60×10^4
\bar{x}_i	1.90×10^2	\bar{x}_i	6.02×10^2	\bar{x}_i	5.66×10^3	\bar{x}_i	6.34×10^4
<i>SD</i>	0.01	<i>SD</i>	0.10	<i>SD</i>	0.05	<i>SD</i>	0.08
<i>RSD</i> (%)	0.38	<i>RSD</i> (%)	3.49	<i>RSD</i> (%)	1.34	<i>RSD</i> (%)	1.61

表 10 实验室 5---北京市门头沟区疾病预防控制中心检验结果

样品编号	检验结果 (MPN/100 mL)	样品编号	检验结果 (MPN/100 mL)	样品编号	检验结果 (MPN/100 mL)	样品编号	检验结果 (MPN/100 mL)
质控样-1	1.69×10^2	低浓度-1	4.70×10^2	中浓度-1	5.34×10^3	高浓度-1	8.42×10^4
质控样-2	1.46×10^2	低浓度-2	7.20×10^2	中浓度-2	4.74×10^3	高浓度-2	6.47×10^4
质控样-3	1.46×10^2	低浓度-3	4.70×10^2	中浓度-3	4.74×10^3	高浓度-3	7.60×10^4
质控样-4	1.55×10^2	低浓度-4	6.60×10^2	中浓度-4	3.61×10^3	高浓度-4	7.86×10^4
质控样-5	1.55×10^2	低浓度-5	3.90×10^2	中浓度-5	7.88×10^3	高浓度-5	8.13×10^4
质控样-6	1.55×10^2	低浓度-6	5.20×10^2	中浓度-6	8.54×10^3	高浓度-6	7.35×10^4
\bar{x}_i	1.54×10^2	\bar{x}_i	5.38×10^2	\bar{x}_i	5.81×10^3	\bar{x}_i	7.64×10^4
<i>SD</i>	0.02	<i>SD</i>	0.10	<i>SD</i>	0.14	<i>SD</i>	0.04
<i>RSD</i> (%)	1.07	<i>RSD</i> (%)	3.67	<i>RSD</i> (%)	3.83	<i>RSD</i> (%)	0.83

表 11 实验室 6---湖北省十堰市疾病预防控制中心检验结果

样品编号	检验结果 (MPN/100 mL)	样品编号	检验结果 (MPN/100 mL)	样品编号	检验结果 (MPN/100 mL)
低浓度-1	2.30×10^2	中浓度-1	2.64×10^3	高浓度-1	3.28×10^4
低浓度-2	2.30×10^2	中浓度-2	3.61×10^3	高浓度-2	3.50×10^4
低浓度-3	4.70×10^2	中浓度-3	2.64×10^3	高浓度-3	3.39×10^4
低浓度-4	2.30×10^2	中浓度-4	4.16×10^3	高浓度-4	3.18×10^4
低浓度-5	2.30×10^2	中浓度-5	4.16×10^3	高浓度-5	3.28×10^4
低浓度-6	4.30×10^2	中浓度-6	3.10×10^3	高浓度-6	3.50×10^4
\bar{x}_i	3.03×10^2	\bar{x}_i	3.39×10^3	\bar{x}_i	3.35×10^4
<i>SD</i>	0.15	<i>SD</i>	0.09	<i>SD</i>	0.02
<i>RSD</i> (%)	6.13	<i>RSD</i> (%)	2.58	<i>RSD</i> (%)	0.38

表12 六家实验室间精密度测定统计结果

实验室 编号	质控样品 (96±19 MPN/100 mL)			低浓度			中浓度			高浓度		
	\bar{x}_i	<i>SD</i>	<i>RSD</i> (%)	\bar{x}_i	<i>SD</i>	<i>RSD</i> (%)	\bar{x}_i	<i>SD</i>	<i>RSD</i> (%)	\bar{x}_i	<i>SD</i>	<i>RSD</i> (%)
1	1.54×10^2	0.02	1.07	6.95×10^2	0.05	1.71	6.71×10^3	0.06	1.63	7.14×10^4	0.03	0.69
2	1.63×10^2	0.03	1.24	5.35×10^2	0.12	4.28	5.69×10^3	0.12	3.31	7.38×10^4	0.04	0.76
3	1.57×10^2	0.03	1.30	5.73×10^2	0.07	2.44	6.40×10^3	0.10	2.58	7.38×10^4	0.04	0.76
4	1.90×10^2	0.01	0.38	6.02×10^2	0.10	3.49	5.66×10^3	0.05	1.34	6.34×10^4	0.08	1.61
5	1.54×10^2	0.02	1.07	5.38×10^2	0.10	3.67	5.81×10^3	0.14	3.83	7.64×10^4	0.04	0.83
6	*	*	*	3.03×10^2	0.15	6.13	3.39×10^3	0.09	2.58	3.35×10^4	0.02	0.38
\bar{x}_i	1.36×10^2			5.41×10^2			5.61×10^3			6.54×10^4		
<i>SD</i>	0.04			0.12			0.11			0.14		
<i>RSD</i> (%)	1.74			4.56			2.85			2.87		

*注：由于疫情致菌株运输受限，此部分数据缺失。

表13 五家实验室间准确度测定统计结果

实验室号	质控样品 (96±19 MPN/100 mL)	
	\bar{x}	回收率 (%)
1	1.54×10^2	110.35
2	1.63×10^2	111.60
3	1.57×10^2	110.78
4	1.90×10^2	114.96
5	1.54×10^2	110.35

7.6.9 与现行检验方法的比对

7.6.9.1 定量检验结果的比对

利用酶底物法和 ISO 11731-2017 法对来自北京市（朝阳区、延庆区、门头沟区）、山东省和湖北省共 170 件实际样品及加标样品中的嗜肺军团菌进行定量检验比对。水样类型包括冷却水、冷凝水和沐浴用水。

对定量数据进行对数处理后，利用 SPSS 统计软件经正态检验显示数据不属于正态分布，因此选用 Wilcoxon 秩和检验进行统计分析，结果显示酶底物法的中位数大于 ISO 检验法所得中位数（ $P=0.000$ ）。 $P<0.05$ 说明两种方法的检验差异有统计学意义，具体结果见表 14。经对阳性孔进行菌型确定实验，结果表明加标样品稀释到 $10^{-7}\sim 10^{-8}$ CFU/mL 时，酶底物法可以检验到嗜肺军团菌，而 ISO 方法则检验不到嗜肺军团菌。由此显示出酶底物法测定水中嗜肺军团菌的灵敏度高于 ISO 法。

表 14 酶底物法和 ISO 法 Wilcoxon 秩和检验统计结果

方法	样品量	百分位数			Z	P
		25th	50th (中位数)	75th		
酶底物法	170	1.49	1.89	2.54	11.311	0.000
ISO 法	170	0.85	1.33	2.04		

与此同时，为了检验两种方法之间的相关性，利用 SPSS 软件对以上定量结果进行了 Spearman 相关性分析，相关系数 r 为 0.965，显示虽然两种方法结果有差异，但结果高度相关。相关分析结果见图 5。两种方法的定量检验结果比较的折线图见图 6。

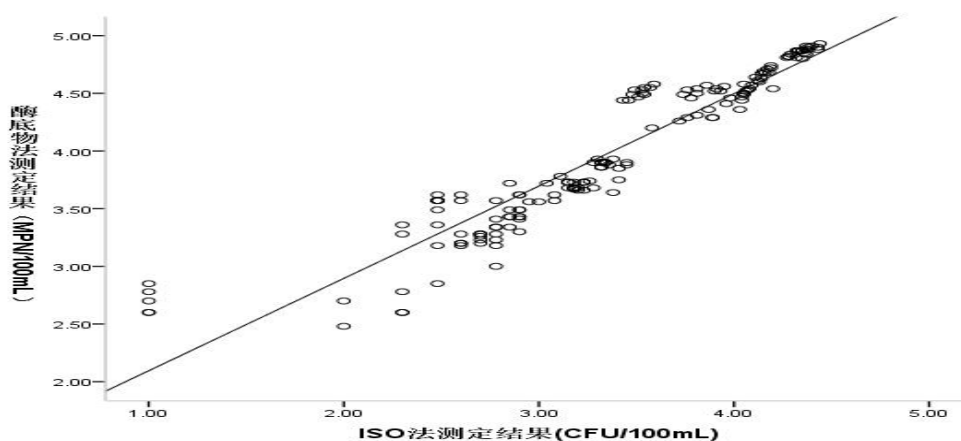


图 5 酶底物法与 ISO 法测定水中嗜肺军团菌的相关性分析

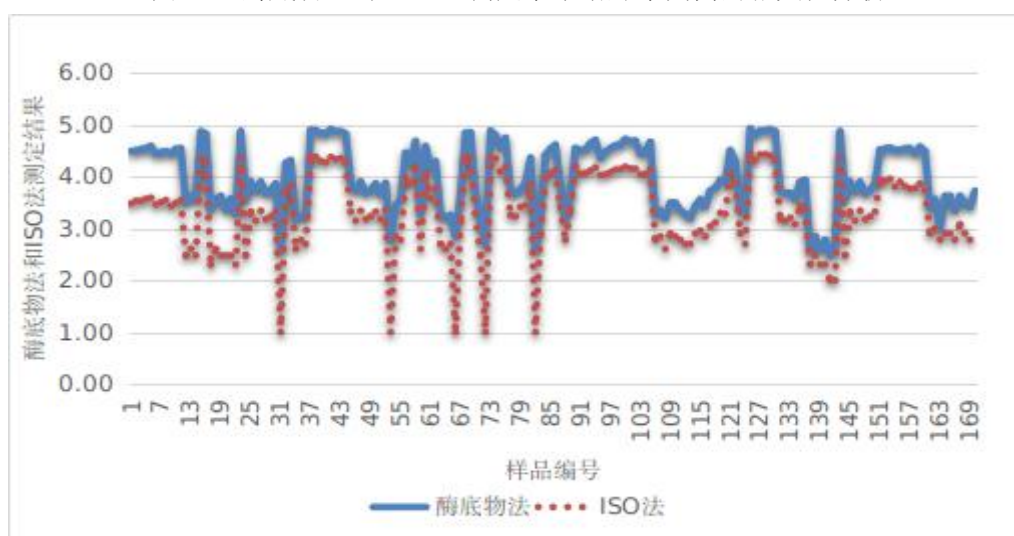


图 6 酶底物法和 ISO 法检验结果比较

7.6.9.2 定性检验结果的比对

利用酶底物法和国标法 GB/T 18204.5-2013 对来自北京市（朝阳区、延庆区、门头沟区）、山东省和湖北省共 696 件实际样品中的嗜肺军团菌进行定性检验比对。水样类型包括冷却水、冷凝水和沐浴用水。具体结果见表 15。

不同类型水样的检出率见表 16 及图 7、8。不同地域水样的样品检出率见图 9、10。经统计分析，嗜肺军团菌阳性率组间比较采用卡方检验，统计结果显示 $P=0.000<0.05$ ，表示两种方法的检出率差异有统计学意义。同时，酶底物法阳性检出率高于国标法。本研究对国标

方法检验为阴性而酶底物法检验阳性的 113 件水经菌型确定实验，发现其中 71 件水的检验结果为真阳性，进一步证实酶底物法测定水中嗜肺军团菌的灵敏度高于国标法。当去除国标方法灵敏度的影响，校正后的酶底物法特异性为 $372/(485-71)=89.85\%$ ，灵敏度为 $(202+71)/(211+71)=96.81\%$ 。

表 15 酶底物法和国标法检验嗜肺军团菌的检验结果

酶底物法	国标法		合计	χ^2	P
	检出	未检出			
检出	202	113*	315	311.388	0.000
未检出	9	372	381		
合计	211	485	696		

*注：113 件样品中有 71 件经菌型确定实验确定为真阳性。

表 16 酶底物法和国标法检验不同类型水样中嗜肺军团菌的检验结果

水样	酶底物法		检出率 (%)	国标法		检出率 (%)
	检出	未检出		检出	未检出	
冷凝水	47	76	38.21	41	82	33.33
冷却水	122	94	56.48	81	135	37.50
沐浴用水	146	211	40.90	89	268	24.93

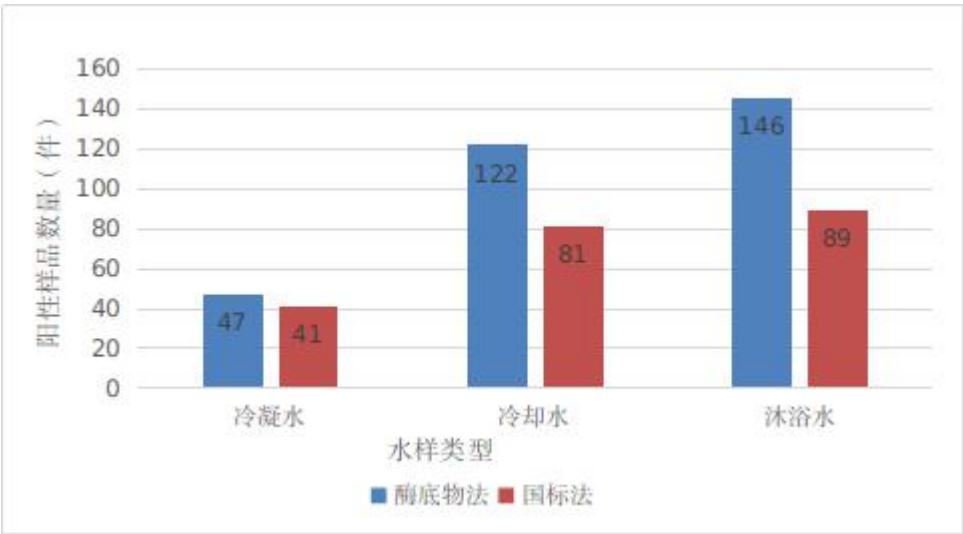


图 7 不同类型水样中酶底物法和国标法的阳性样品量对比图

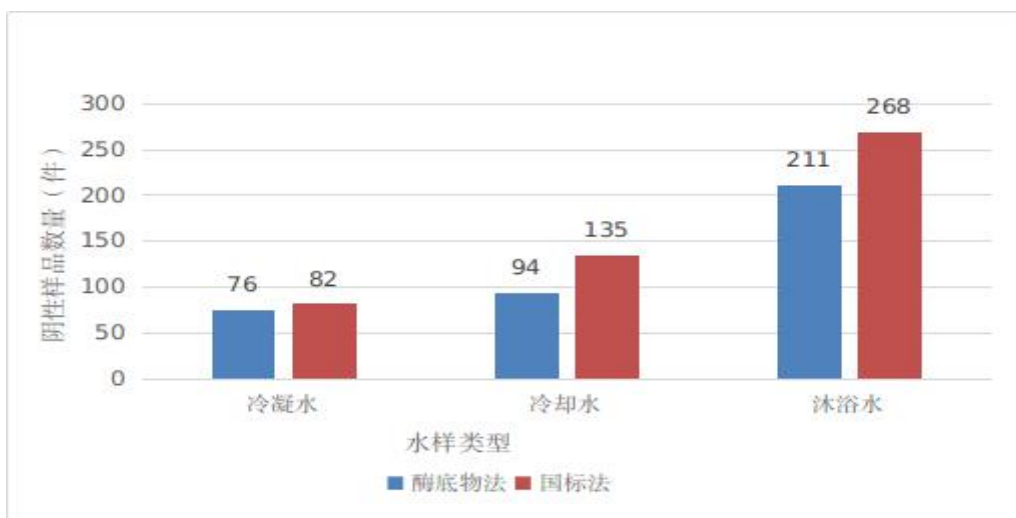


图 8 不同类型水样中酶底物法和国标法的阴性样品量对比图

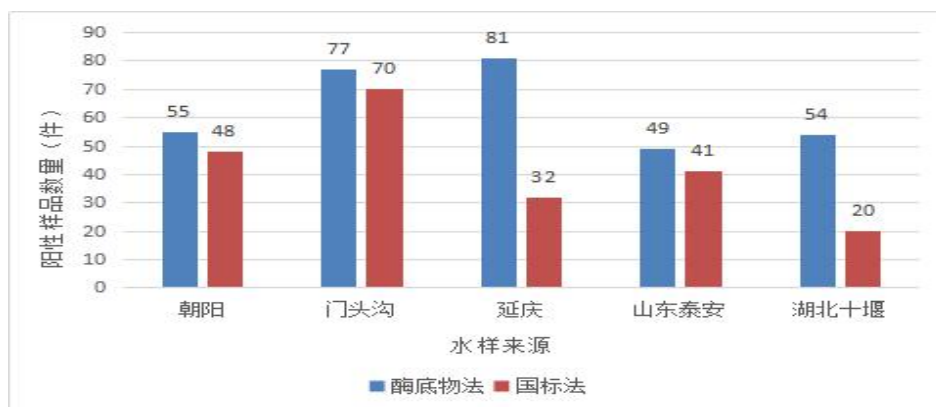


图 9 不同地区酶底物法和国标法的阳性样品量对比图

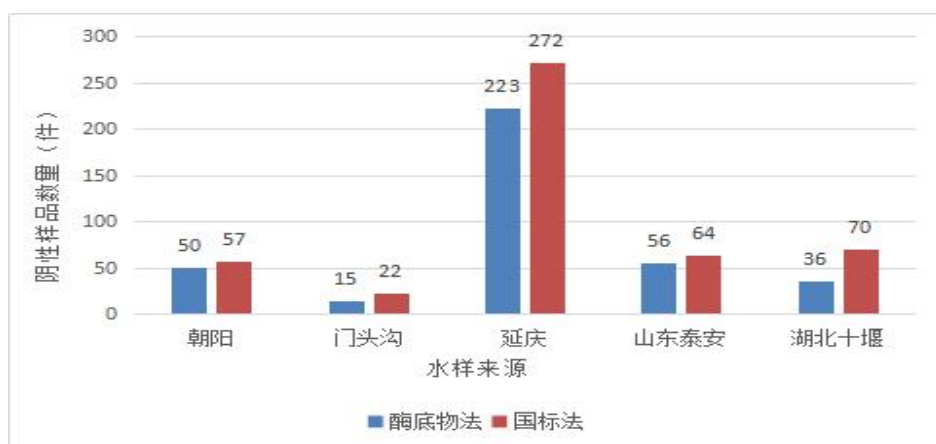


图 10 不同地区酶底物法和国标法的阴性样品量对比图

7.7 质量控制

7.7.1 每批样品应进行空白对照试验，并使用有证标准菌株进行阳性

和阴性对照试验（7.6.2）。

7.7.2 按照质控要求，定期使用有证标准菌株/质控样品进行质量控制。

7.8 生物安全

嗜肺军团菌检验应按照三类病原微生物的生物安全要求进行管理。

8 方法验证单位相关信息

8.1 参加方法验证实验室的基本情况

表 17 参与验证实验室硬件情况

验证实验室	仪器名称	规格型号	性能状况	仪器编号
北京市延庆区疾病预防控制中心	程控定量封口机 (美国)	IDEXX Quanti-tray Sealer PLUS	正常	F-155
	生化培养箱	上海三发 250 型	正常	95
	CO ₂ 培养箱	Thermo 371	正常	125
	膜过滤系统	美国颇尔 6 联	正常	F-007
北京市朝阳区疾病预防控制中心	程控定量封口机 (美国)	IDEXX Quanti-tray Sealer PLUS	正常	QTP131719025 46
	六联不锈钢微生物 过滤系统	Sartorius	正常	FY-154-FWJ-76
	CO ₂ 恒温培养箱	371	正常	Y-254-WJ-31
	电热恒温培养箱	DHP-9272	正常	Y-280-WJ-44
	程控定量封口机	IDEXX Quanti-tray Sealer Plus	正常	QTP131801031 78
山东省泰安市疾病预防控制中心	Surtorius stedim/ 三联不锈钢微生物 过滤系统	250 Funnec	正常	16407-25-ALK
	CO ₂ 培养箱	HF151	正常	0806L0426CE
	恒温电热培养箱	DHP-9082	正常	113147

北京市门头沟区疾病预防控制中心	程控定量封口机 (美国)	IDEXX Quanti-tray Sealer PLUS	正常	QTP131719025 58
	MIR-262 型恒温培养箱	MIR-262	正常	W-064
	水样真空抽滤设备	2009-D 型	正常	W-022
	MCO-15AC CO ₂ 培养箱	MCD-15AC	正常	W-001
	程控定量封口机 (美国)	IDEXX Quanti-tray Sealer PLUS	正常	QTP131719025 37
湖北省十堰市疾病预防控制中心	生化培养箱	上海贺德 LRHS-300BF	正常	1710004
	CO ₂ 培养箱	力康 HF212UV	正常	0914R0722CE
	膜过滤系统	Sartorius Stedim	正常	16828

8.2 参加方法验证人员的基本情况

表 18 参与验证实验室人员情况

姓名	职称	从事工作年限	单位名称
刘艳妍	技师	10	北京市延庆区疾病预防控制中心
赵璐	技师	9	北京市延庆区疾病预防控制中心
王健	技师	5	北京市延庆区疾病预防控制中心
刘凡	主管技师	13	北京市延庆区疾病预防控制中心
任淑敏	主管技师	19	北京市延庆区疾病预防控制中心
高艳	主任技师	25	北京市朝阳区疾病预防控制中心
张淑	技师	3	北京市朝阳区疾病预防控制中心
张新峰	副主任技师	24	山东省泰安市疾病预防控制中心
王长勇	主管医师	19	山东省泰安市疾病预防控制中心
张洋洋	技师	3	山东省泰安市疾病预防控制中心
苏健	主管技师	15	北京市门头沟区疾病预防控制中心
刘海涛	副主任技师	14	北京市门头沟区疾病预防控制中心
张博文	技师	7	北京市门头沟区疾病预防控制中心
吕秋艳	副主任技师	20	北京市门头沟区疾病预防控制中心

杨康	主管技师	9	湖北省十堰市疾病预防控制中心
李艳丽	主管技师	6	湖北省十堰市疾病预防控制中心
刘兰芳	主管技师	10	湖北省十堰市疾病预防控制中心
杨艳	主管技师	7	湖北省十堰市疾病预防控制中心

9 重大意见分歧的处理经过和依据

依据专家建议，鉴于我国《公共场所卫生指标与限值要求》（GB 37488-2019）仅对集中空调通风系统的冷却水和冷凝水以及沐浴用水中的嗜肺军团菌做出限值要求，因此将本标准的检验水样类型由立项时的冷却水、冷凝水、沐浴用水和景观水调整为冷却水、冷凝水和沐浴用水。

依据专家建议，根据标准题目的命名规则对本标准的题目进行了调整，由立项时的《水中嗜肺军团菌酶底物法定量检验法》调整为《水中嗜肺军团菌检验 酶底物定量法》。

依据专家建议，为了扩大水样来源的范围以更好的研究方法的适用性，将验证单位由北京一地扩大至北京、山东和湖北三个省市。同时，样本量由 100 件不同类型水样增加到约 700 件水样。

10 对实施本标准的建议

本标准采用酶底物法测定水中嗜肺军团菌，具有操作简便，精密度、准确度、灵敏度、特异性较高，检出数据可定量等优点。经过成本核算，酶底物法测定水中嗜肺军团菌的经济成本与现行国标方法 GB/T 18204.5-2013 基本持平。

酶底物法定量检验水中嗜肺军团菌已被多个国家验证认可，用于判断水体受嗜肺军团菌的污染程度，从而间接反映水质的污染状况和环境卫生质量。鉴于现行的国标方法 GB/T 18204.5-2013 只能满足定性检验的需求，无法对嗜肺军团菌的污染起到精准防控的作用，因此建议本标准建立后，作为嗜肺军团菌的补充检验方法。

各单位验证结果见附件 1。

参考文献:

- [1] 郭沛,赵龙,胡翻.公共场所水环境中嗜肺军团菌的快速检验方法 [J].生物技术通报, 2019,35(3):203-209.
- [2] 叶丹.江苏省公共场所环境嗜肺军团菌污染现状及从业人员感染情况调查分析[D].北京: 中国疾病预防控制中心,2018.
- [3] Hayes-Phillips D, Bentham R, Ross K, Whiley H. etal. Factors Influencing Legionella Contamination of Domestic Household Showers. Pathogens. 2019,8(1):27-29.
- [4] LEGNANI PP, LEONI E, CORRADINI N. Legionella contamination of hospital water supplies : monitoring of private healthcare facilities in Bologna , Italy[J]. J Hosp Infect, 2002, 50(3):220-223.
- [5] Chaudhry R, Sreenath K, Arvind V. Legionella pneumophila Serogroup 1 in the Water Facilities of a Tertiary Healthcare Center, India [J] . Emerg Infect Dis. 2017, 23(11): 1924 – 1925.
- [6] 郭宝羨,张丽蓉,姚海燕等.漳州市公共场所沐浴用水嗜肺军团菌污染状况调查[J].热带医学杂志. 2019,19(4):502-505.
- [7] 徐俊,李达,郭勇峰等.北京市西城区淋浴热水中嗜肺军团菌污染状况调查[J].环境卫生学杂志. 2018,8(3):243-246.
- [8] 牟敬锋,段永翔,严宙宁等.公共场所喷泉水嗜肺军团菌污染贝叶斯网络预警模型研究[J].中国预防医学杂志.2017,18(10):742-746.
- [9] 肖光文,陈洪谋,萧颖欣.梅州城区部分公共场所水中嗜肺军团菌污染状况分析[J].热带医学杂志. 2020, 20(12):637-1640.
- [10] PAULL,BILLP,LEEMR. Risk management for Legionellosis [J]. ASHRAE Journal,2015,57(10):14-16,18,20,23.
- [11] Developing a water management program to reduce Legionella growth and spread in buildings:A practical guide to implementing industry standards [R]. Atlanta:CDC, 2016.
- [12] MCDADE J E . Legionella and the prevention of legionellosis [J] . Emerging Infectious Disease,2008,14(6):1006—1006.
- [13] Health and Safety Executive. Legionnaires' disease:Technical guidance [R].2014
- [14] UK.Blue Book. Part2 The determination of Legionella bacteria in waters and other environmental samples – Culture Methods for their detection and enumeration[R]. SCA, 2020.
- [15] 曾捷, 吕石磊.《健康建筑评价标准》水章节解读[J]. 建筑技术, 2018,49(5):486-489.
- [16] US.Centers for disease control and prevention . Procedures for the recovery of Legionella from the environment [M].Atlanta:CDC, 2005.
- [17] International organization for standardization . Water quality enumeration of Legionella:[R]. 2017.
- [18] SARTORY DP, SPIES K, LANGE B, etal. Evaluation of a most probable number method for the enumeration of Legionella pneumophila from potable and related water samples [J]. Letters in Applied Microbiology,2017,64(4):271-275.
- [19] PETRISEK R, HALL J. Evaluation of a most probable number method for the enumeration of Legionella pneumophila from North American potable and non potable water samples [J]. Journal of Water&Health,2017,16(1):25-33.
- [20] RECHMM, M. SB, K. DJ. Evaluation of legiolert for quantification of Legionella pneumophila from non-potable water [J]. Current Microbiology,2018,75(10):1282-1289.

- [21] Javier Checa , Iago Carbonell , Neus Manero, et al. Comparative study of Legiolert with ISO 11731-1998 standard method-conclusions from a Public Health Laboratory [J]. Journal of Microbiological Methods,2021,186:1-12.
- [22] Silvia N. Monteiro , Adriana M. Robalo , Ricardo J. Santos.Evaluation of Legiolert™ for the Detection of Legionella pneumophila and Comparison with Spread-Plate Culture and qPCR Methods [J]. Current Microbiology.2021,78:1792–1797.
- [23] Kirsten Spiesa , Stefan Pleischla , Bernd Langeb , et al . Comparison of the Legiolert™/Quanti-Tray® MPN test for the enumeration of Legionella pneumophila from potable water samples with the German regulatory requirements methods ISO 11731-2 and ISO 11731 [J]. International Journal of Hygiene and Environmental Health.2018,221:1047–1053.
- [24] 付喜梅, 黄庆华, 余秋华. 两种检验嗜肺军团菌方法的对比[J].生物化工, 2020,6(3):97-99.
- [25] 陈智, 王芳, 石斌等.集中空调通风系统冷却塔水中嗜肺军团菌的 Legiolert 酶底物法与分离培养法的比较.环境与健康杂志, 2020,37(7):645-647.
- [26] 盛东方,李伟英,李悦等. 建筑供水系统典型条件致病菌存在水平及影响因素[J]. 净水技术,2019,38(12):46-54.
- [27] BARRETTEI. Comparison of legiolert and a conventional culture method for detection of Legionella pneumophila from cooling towers in Québec [J] . Journal of AOAC INTERNATIONAL,2019(4):1235-1240.
- [28] Standing committee of analysis.The determination of Legionella bacteria in waters and other environmental samples(2020)-part 2-Culture Methods for their detection and enumeration [S].