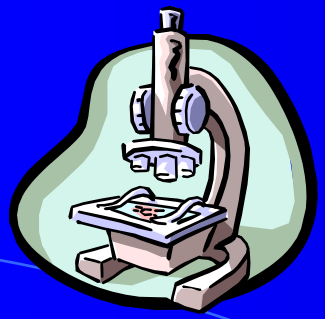


WHCDC

军团菌与军团菌检测

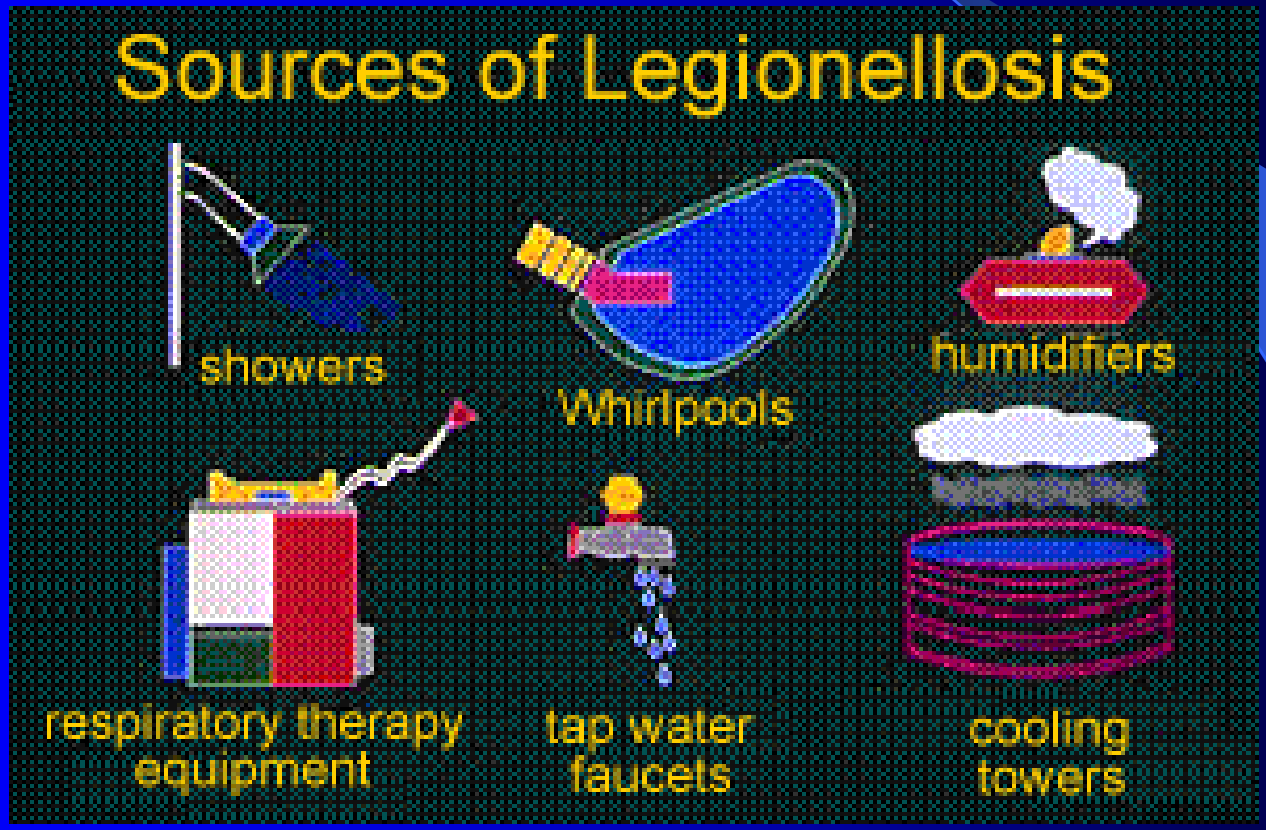
- 常存在于人工管道的水源中（空调冷却管，淋浴头，呼吸机等），故可以气溶胶传播
- 引起军团病，经呼吸道传播（夏、秋季）

三种临床类型

  - 流感样型（旁地亚克热）：轻症、发热、寒战、上感症状、无肺炎
  - 肺炎型（军团病）：重症、高热、咳嗽、肺炎、多器官衰竭死亡
  - 肺外感染型（继发感染）：多脏器感染症状

- 细胞免疫为主（胞内产生菌），无疫苗
- 治疗首选红霉素

如何感染人的？


Sources of Legionellosis
showers
Whirlpools
humidifiers
respiratory therapy equipment
tap water faucets
cooling towers

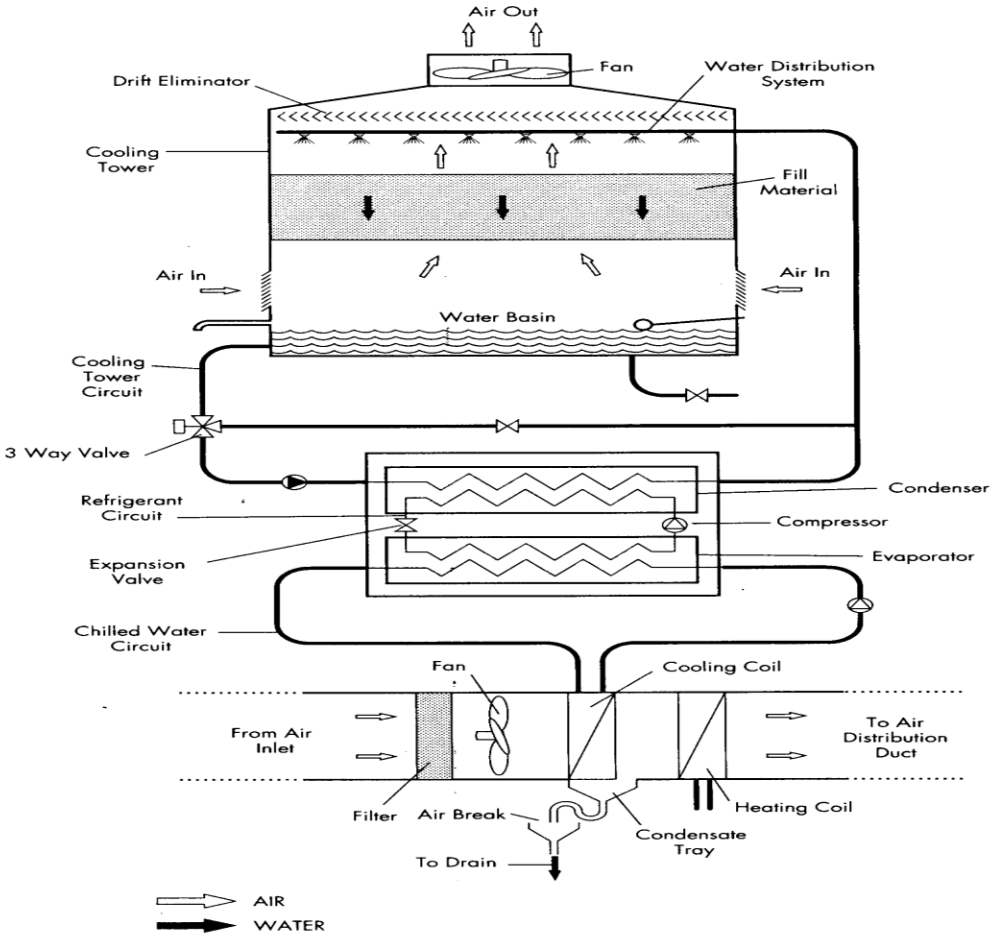
军团菌概况

- **发现**： 1976年美国费城 爆发，1977年正式发现，1978年命名
- **分类**： 伯杰氏细菌分类最新归为一个科，一个属，共有42个种，60多个血清型
- **分布**： 极其广泛，但都与水有关
- **疾病**： 军团菌病，共有3种临床类型 ①重症肺炎型 ②轻型Pontiac fever ③肺外感染型

军团菌病的流行病学

- **传染源：** 被污染的各种水源
- **传播途径：** 含军团菌的气溶胶通过空气由人直接吸入肺泡发病
- **易感人群：** 免疫力尤其是细胞免疫力低下者
- **流行季节：** 夏、秋季
- **发病率：** WHO估计为12/10万，医源性肺炎占第二位，25%，CAP欧盟资料约10%
- **死亡率：** 未经正确治疗时高达20%！

FIGURE 4. SCHEMATIC LAYOUT OF AN AIR-CONDITIONING SYSTEM (OPEN CIRCUIT)



人群感染现状

- 北京：饭店健康工作人员军团菌感染的阳性率为9.9%，而非从事饭店行业的健康人群的阳性率只有3.5%。
- 对写字楼中工作人员的军团菌感染的调查发现其抗体滴度超过1：64者高达27.3%。
- 2002年我们对457例从事饭店行业的健康人群的调查发现超过1：64者高达11.3%。

空调系统冷凝水导致军团菌病暴发流行

- 我国某市1997年～1999年对四、五星级8酒店空调冷却塔水进行监测，军团菌污染率高达85.7％
- 2000年7月某写字楼多名员工出现发烧、咽喉痛、肌肉痛，在312名员工中共发病193人，发病率61.9％。查证是一次由空调系统冷凝水导致的上呼吸道感染型军团菌病暴发

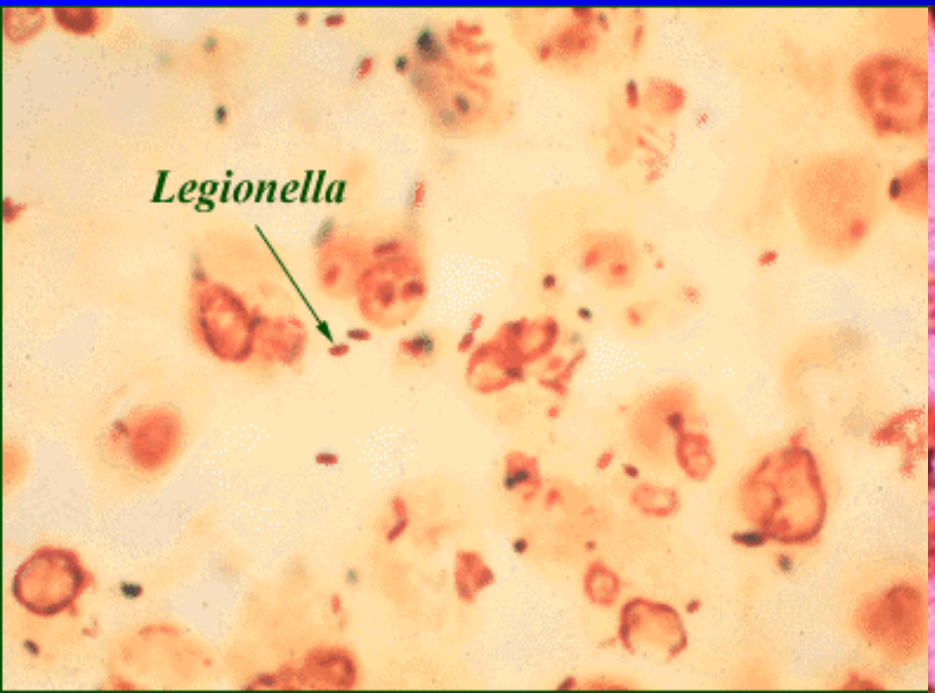
高危因素

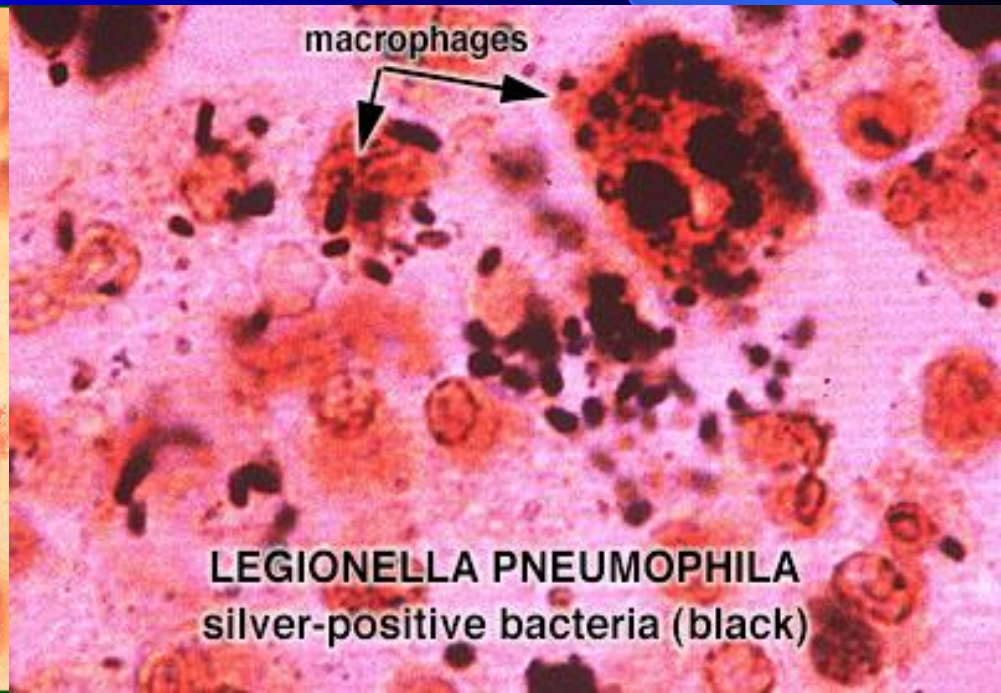
- 军团菌是一种条件致病菌， 易感者多见于男性、年迈体弱和吸烟酗酒者
- 原有心肺疾病、糖尿病、肾衰弱、肿瘤、艾滋病者
- 使用糖皮质激素或免疫抑制剂者
- 孕妇、幼儿、 透析或器官移植者
- 入住ICU 患者。Pontiac 型无明显危险因素

军团菌肺炎X线表现

- 胸片的表现有多形性、多样性特征，缺乏特异性
- 与临床表现及预后往往不一致
- 可表现为斑片状、纱网状阴影，边缘清楚的小结节样阴影，条索状阴影或弥漫性肺浸润等
- 少数可形成空洞
- 胸腔积液相对较多，亦可先于浸润阴影出现
- 肺部病灶吸收较一般肺炎缓慢，经治疗后约50%于1～2 月才完全消散，少数可延至数月，残留纤维条索状阴影，有认为军团菌病的吸收最慢

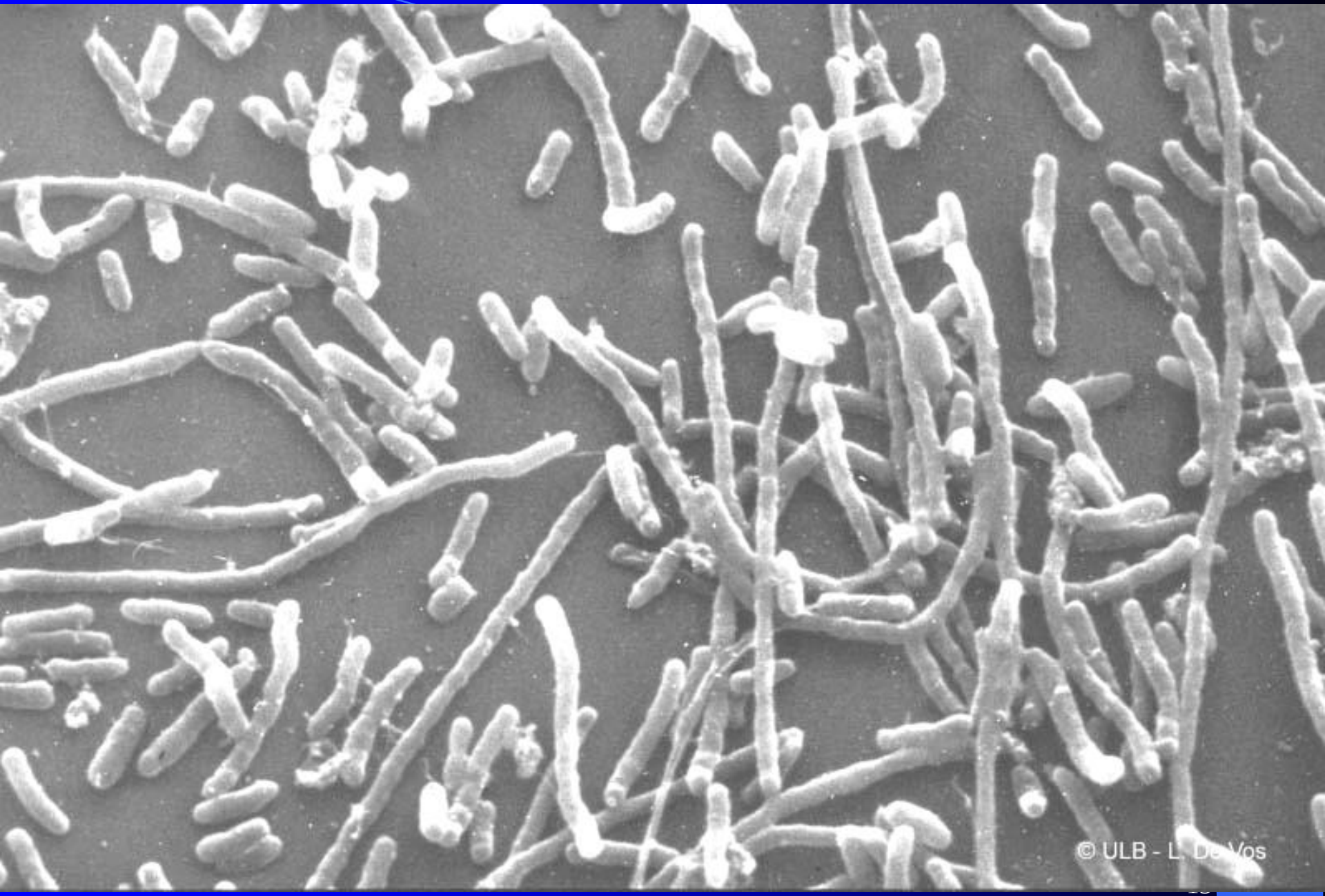
- G—短小杆菌，多形性，有鞭毛、菌毛及微荚膜，无芽胞





形态染色

- 革兰阴性，但不易被着色
- 杆菌，形态有多形性
- Gimenen染色，菌体呈红色，背景为绿色
- 不形成芽孢，无荚膜，
- 有端生或侧生鞭毛


© ULB - L. De Vos

军团菌革氏染色图片
Legionella

致病物质

- 微荚膜
- 菌毛
- 毒素
- 多种酶

培养特性

- 营养要求高
- 专性需氧
- 需2.5～5％CO_2
- 生长缓慢
- 常用培养基及菌落特征

BCYE培养基：灰白色、圆形光滑湿润菌落

F-G培养基：针尖大小、黄色荧光

抗原结构

- O 抗原：具有型特异性
- 军团菌病约90%的是由嗜肺军团菌所致, 已发现15个血清型，其中以Lp1血清型最常见, Lp6次之。

抵抗力

- 分布广泛、抵抗力强
- 水中存活时间长
- 军团菌病的主要污染源是供水系统及冷却塔和空调系统

军团菌的检测

ICS 91.140.30
C 51

WS

中华人民共和国卫生行业标准

WS 394—2012

公共场所集中空调通风系统卫生规范

Hygienic specification of central air conditioning ventilation system in public buildings

集中空调系统冷却水、冷凝水中嗜肺军团菌检验方法

嗜肺军团菌　legionella pneumophila

样品经培养在GVPC琼脂平板上生成典型菌落，并在BCYE琼脂平板上生长而在L-半光氨酸缺失的BCYE琼脂平板不生长，进一步经生化实验和血清学实验鉴定确认的菌落。

仪器和设备

1 平皿：ϕ90 mm。

2 CO_2 培养箱：35 ℃～37 ℃。

3 紫外灯：波长 360 nm±2 nm。

4 滤膜过滤器。

5 滤膜：孔径 0.22 μm～0.45 μm。

6 真空泵。

7 离心机。

8 涡旋振荡器。

9 普通光学显微镜、荧光显微镜。

10 水浴箱。

11 广口采样瓶：玻璃或聚乙烯材料，磨口，容积 500 mL。

真空泵

过滤瓶

过滤膜及过滤器

体视显微镜

二氧化碳培养箱

培养基和试剂

1 GVPC 琼脂平板。
2 BCYE 琼脂平板。
3 BCYE-CYE 琼脂平板。
4 革兰氏染色液。
5 马尿酸盐生化反应管。
6 军团菌分型血清试剂。

采样

B.5.1 将广口采样瓶(B.3.11)用前灭菌。

B.5.2 每瓶中加入 $Na_2S_2O_3$ 溶液(c=0.1 mol/L)0.3 mL~0.5 mL,中和样品中的氧化物。

B.5.3 水样采集位置:冷却水采样点设置在距塔壁 20 cm、液面下 10 cm 处,冷凝水采样点设置在排水管或冷凝水盘处。

B.5.4 每个采样点依无菌操作取水样约 500 mL。

B.5.5 采集的样品 2 d 内送达实验室,不必冷冻,但要避光和防止受热,室温下贮存不得超过 15 d。

样品处理

B.6.1 样品的沉淀或离心：如有杂质可静置沉淀或 1 000 r/min 离心 1 min 去除。

B.6.2 样品的过滤：将经沉淀或离心的样品通过滤膜(B.3.5)过滤，取下滤膜置于 15 mL 灭菌水中，充分洗脱，备用。

B.6.3 样品的热处理：取 1 mL 洗脱样品，置 50 ℃水浴(B.3.10)加热 30 min。

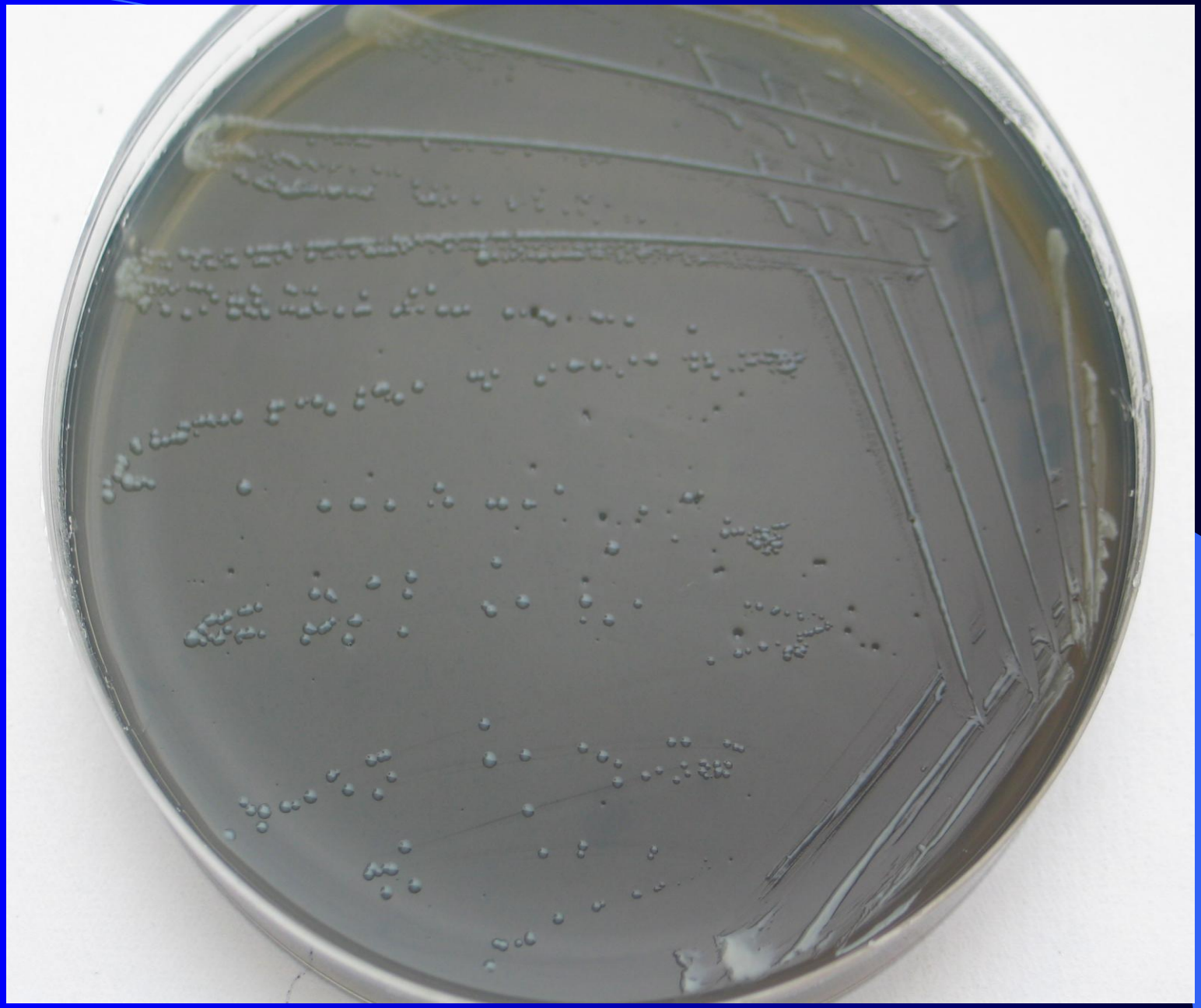
B.6.4 样品的酸处理：取 5 mL 洗脱样品，调 pH 至 2.2，轻轻摇匀，放置 5 min。

接种与培养

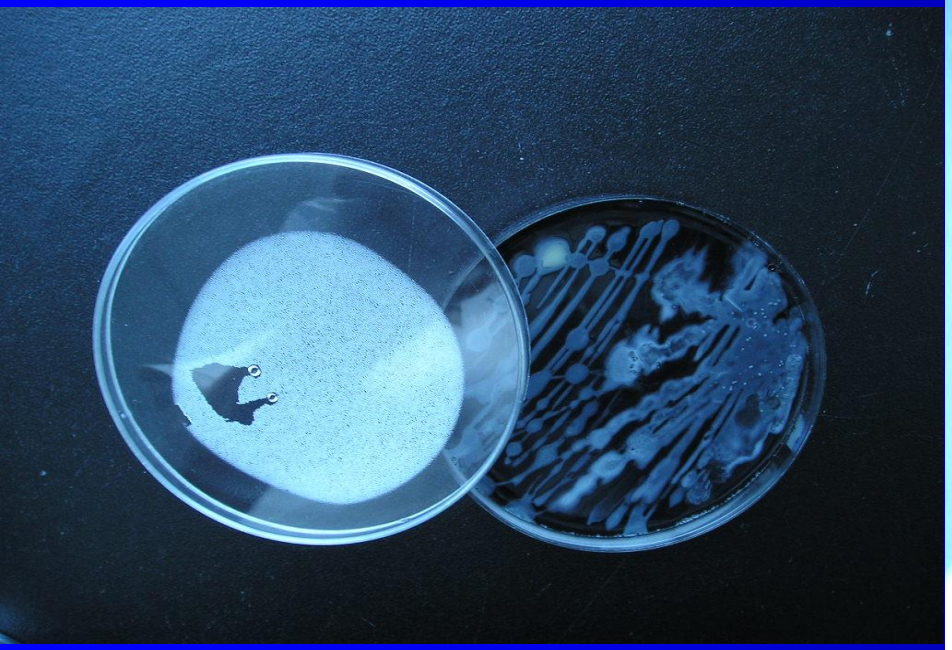
B.6.5 样品的接种：取洗脱样品(B.6.2)、热处理样品(B.6.3)及酸处理样品(B.6.4)各 0.1 mL，分别接种 GVPC 平板(B.4.1)。

B.6.6 样品的培养：将接种平板静置于 CO_2 培养箱(B.3.2)中，温度为 35 ℃～37 ℃，CO_2 浓度为 2.5%。无 CO_2 培养箱可采用烛缸培养法。观察到有培养物生成时，反转平板，孵育 10 d，注意保湿。

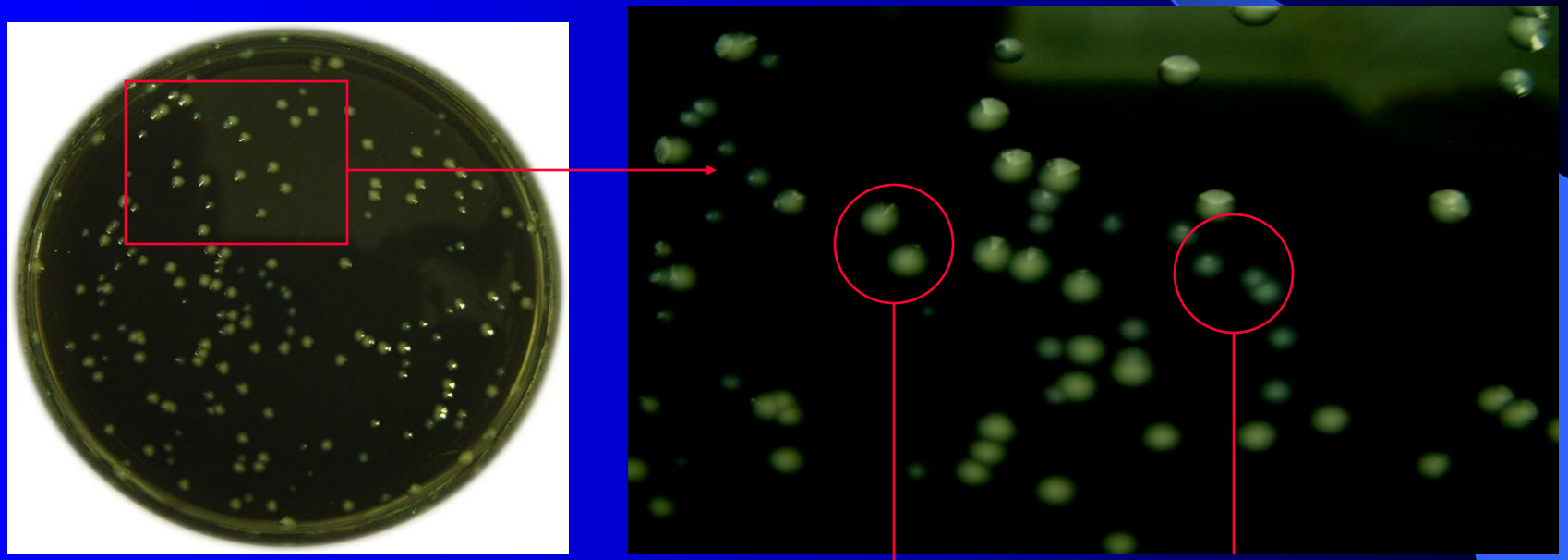
B.6.7 菌落观察：军团菌生长缓慢，易被其他菌掩盖，从孵育第3天开始每天在显微镜(B.3.9)上观察。军团菌的菌落颜色多样，通常呈白色、灰色、蓝色或紫色，也能显深褐色、灰绿色、深红色；菌落整齐，表面光滑，呈典型毛玻璃状，在紫外灯下，部分菌落有荧光。



军团菌菌落形态(CYE琼脂培养基)

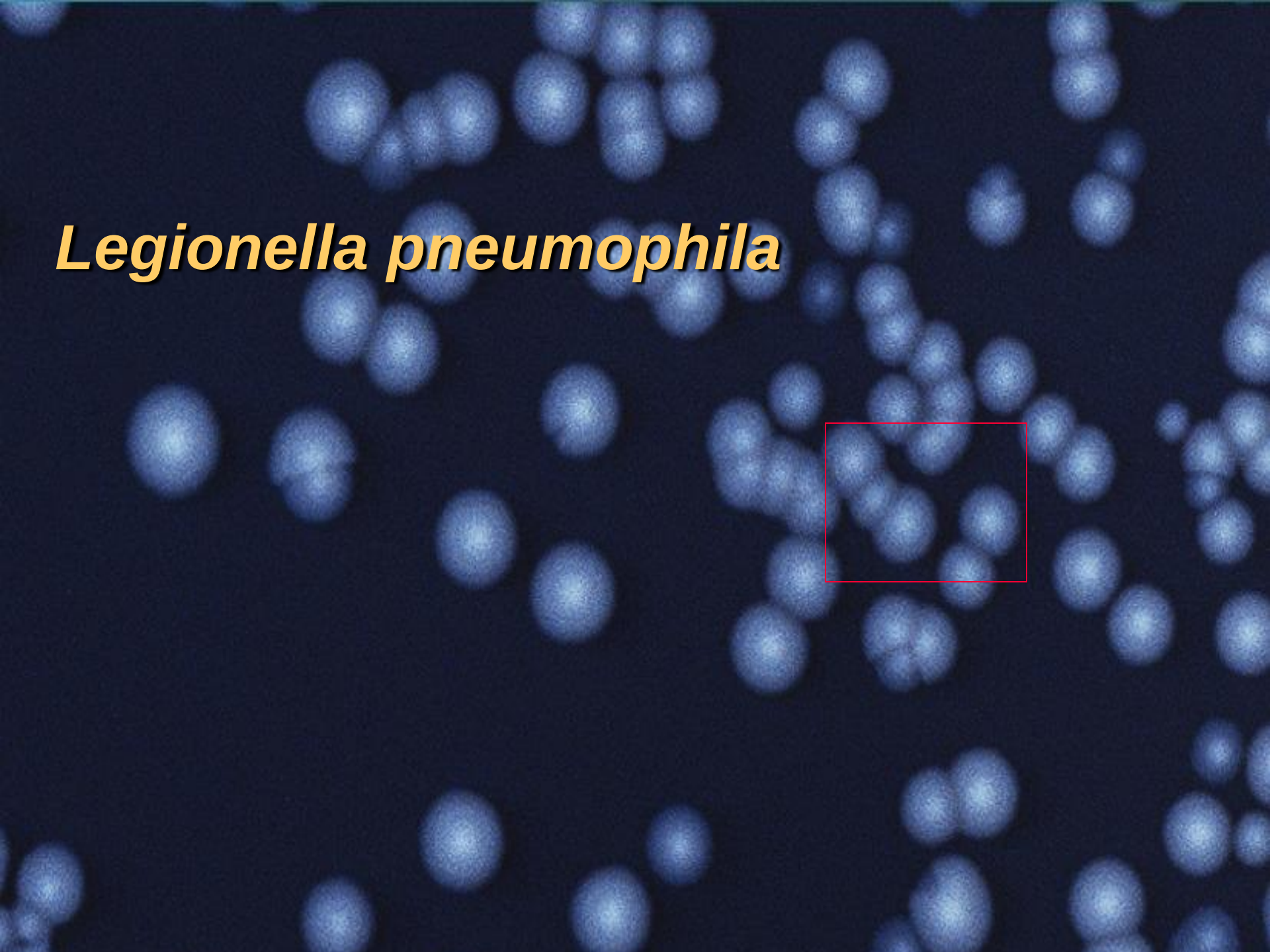


GVPC 平板中军团菌菌落特征



非军团菌

Legionella pneumophila
（灰兰色可疑菌落）


Legionella pneumophila

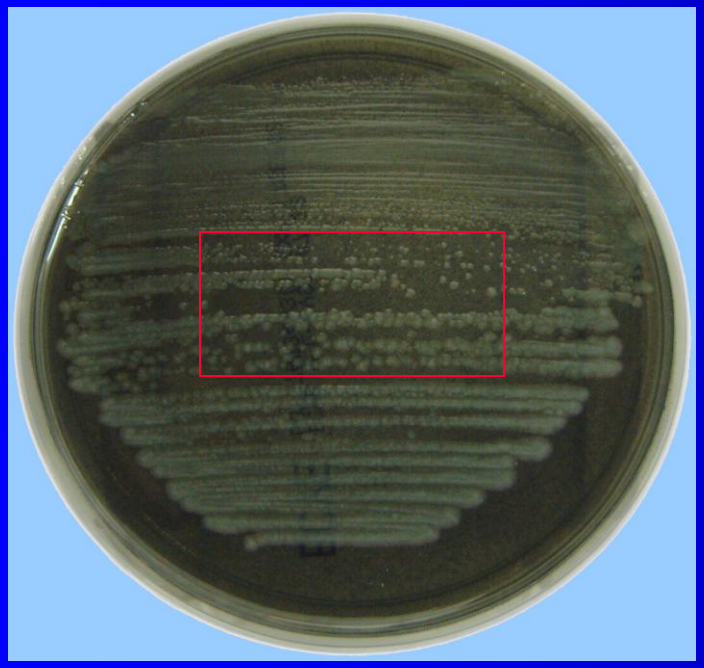
Legionella pneumophila

确定嗜肺军团菌

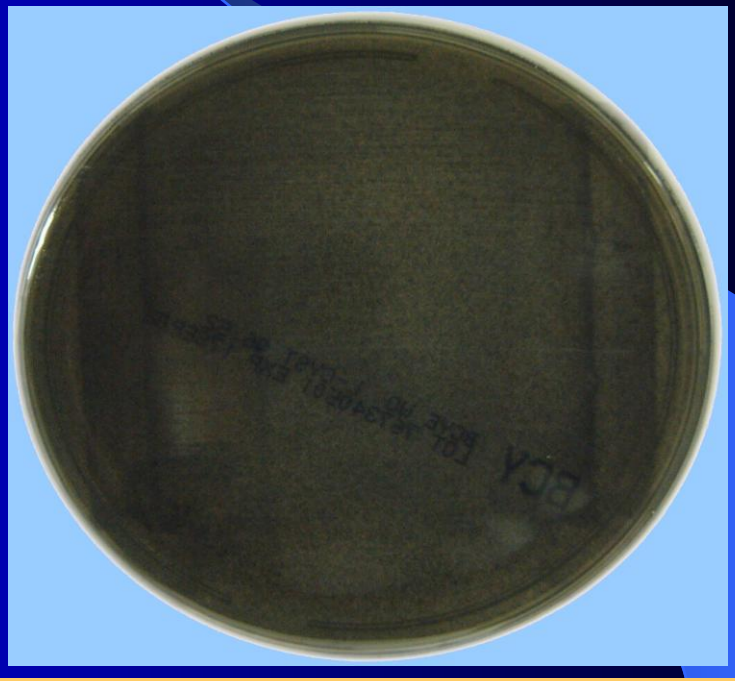
B.6.8 菌落验证:从平皿上挑取2个可疑菌落,接种BCYE琼脂平板(B.4.2)和L-半光氨酸缺失的BCYE琼脂平板(B.4.3),35 ℃~37 ℃培养2 d,凡在BCYE琼脂平板上生长而在L-半光氨酸缺失的BCYE琼脂平板不生长的则为军团菌菌落。

B.6.9 菌型确定:应进行生化培养与血清学实验确定嗜肺军团菌。生化培养:氧化酶(-/弱+),硝酸盐还原(-),尿素酶(-),明胶液化(+),水解马尿酸。血清学实验:用嗜肺军团菌诊断血清进行分型。

Legionella pneumophila



BCYE ♋ 平板（含 L-半胱胺酸）



BCYE ♋ 平板（不含 L-半胱胺酸