

· 论 著 ·

深圳市外环境水源军团菌污染调查

张然¹, 陈桂冰², 林爱红¹, 沈振华¹

摘要:目的 了解深圳市外环境中不同水体军团菌污染和血清型别分布状况。方法 利用传统的检验方法与实时荧光 PCR 技术相结合,对深圳市环境中 243 份水源进行军团菌的检测,用传统细菌分离培养法分离鉴定,用实时荧光 PCR 法加以验证。结果 共检测环境水源 243 份,52 份水样检出军团菌阳性,其中 49 份水样为嗜肺军团菌,3 份水样为非嗜肺军团菌,军团菌和嗜肺军团菌总检出率分别为 21.4%(52/243)和 20.2%(49/243);空调系统嗜肺军团菌检出率为 25%(29/116),宾馆淋浴热水嗜肺军团菌检出率为 23.3%(20/86),二次供水、游泳池水、景观水池水均未检出军团菌。血清型以 LP1 和 LP6 为优势菌型,占检出菌的 65.3%(32/49)和 22.5%(11/49),LP3、LP5、LP6、LP7、LP10 均检出 1 株。结论 深圳市环境水源中军团菌污染主要分布于空调冷却塔水和宾馆淋浴热水中,嗜肺军团菌血清型以 LP1、LP6 为主,相关部门需引起足够重视,防止军团菌病发生。

关键词: 环境水源;冷却塔水;淋浴热水;军团菌;嗜肺军团菌

中图分类号:R378.99 文献标识码:A 文章编号:1009-9727(2012)6-697-03

Survey of distribution of Legionellae in environmental water source in Shenzhen. ZHANG Ran, CHEN Gui-bing, LIN Ai-hong et al. (Shenzhen Municipal Center for Disease Control and Prevention, Shenzhen 518055, Guangdong P. R. China)

Abstract: Objective To investigate the distribution state of Legionellae contamination and serological typing Legionella in environmental water systems of Shenzhen. Methods The 243 environmental water samples were detected and Legionella was isolated and cultured with traditional method. Real time fluorescent PCR method was used to confirm the results. Results In 243 environmental water samples, Legionella was detected in 52 samples including 49 samples positive for Legionella pneumophila, 3 samples positive for non-Legionella pneumophila and total contamination rate of Legionella and Legionella pneumophila were 21.4%(52/243) and 20.2%(49/243). The Legionella pneumophila rate of cooling tower water, shower warm water were 25%(29/116), 23.3%(20/86). No Legionella was detected in other water samples. LP1 and LP6 were predominant serotypes accounted for 65.3% (32/49) and 22.5%(11/49). Conclusion Cooling tower water and shower warm water in hotels in Shenzhen were contaminated with legionella, measures be adopted to control the potential threat of Legionella to the public.

Key words: Environmental water systems; Cooling tower water; Shower warm water; Legionella; Legionella pneumophila

军团菌是引起人类军团菌病的重要病原体,也是非典型性肺炎的主要病原菌之一。军团菌是一类水生菌群,在环境水源中分布甚广,曾在河水、溪水、污染的热水、温泉水和湖岸边的水中均分离到^[1],与现代生活息息相关的人工水环境—空调系统的冷却塔水、淋浴热水、高层建筑饮用水(二次供水)、景观水池水,甚至游泳池水均可以是军团菌生存定居的小生境。为了解深圳市环境中不同水体军团菌污染分布状况,笔者于 2010 年 10 月~2011 年 12 月对环境水源进行了军团菌污染调查。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样本来源 随机采集高层建筑(宾馆、写字楼)空调系统冷却塔水及冷凝水 116 份、宾馆淋浴热水

86 份、二次供水 15 份、游泳池水 10 份、景观水池水 6 份,共采集 243 份环境水源。采用灭菌玻璃瓶按照无菌操作的规程,各采集环境水 500 ml,当日送实验室进行检测。

1.1.2 仪器及试剂 Mx3005P 荧光定量 PCR 仪(美国 Stratagene 公司),CO₂ 培养箱(美国 Thermo 公司);干浴器(型号 MD-OZiV) GVP 培养基 OXOID 提供,BCYE 培养基 OXOID 提供,嗜肺军团菌诊断血清(Lp1~Lp15)日本生研提供,军团菌、嗜肺军团菌实时荧光 PCR 检测试剂盒及 DNA 提取试剂盒由深圳生科源技术有限公司提供,嗜肺军团菌阳性标准菌株:ATCC33152 购自上海宝录生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 样本预处理 将经沉淀的水样通过孔径

作者单位:1.深圳市疾病预防控制中心微生物检验科 广东 深圳 518055; 2.深圳市中医院 广东 深圳 518033

作者简介:张然(1966~),女,副主任技师,主要从事微生物检验工作。

0.45μm 滤膜过滤,充分洗脱,备用。取 1ml 洗脱样品置于 50℃ 水浴加热 30min 进行热处理,吸取等量的 PH2.2HCL-KCL 缓冲液(3.9ml 0.2mol/L HCl+25ml 0.2mol/L KCl 配成 PH2.2 缓冲液),振荡混匀后静置 10min 进行酸处理,用 0.1mol/L KOH 终止酸处理,将试样 pH 调至 7.0 左右。

1.2.2 分离培养 取 0.1ml 酸处理混合液,接种 GVPC 平板,置 CO₂ 培养箱,于 37℃ 5.0%CO₂ 条件下培养 1~10d,注意保湿。每日观察生长情况,如 24h 长出的则是杂菌,如 72h 长出的则为可疑军团菌。

1.2.3 军团菌的鉴定 GVPC 平板培养 72h 后生长的菌落形态为灰白色或紫色,圆形稍凸、湿润光滑、呈毛玻璃状,挑起似牙膏状粘稠,新鲜生长出的菌落边缘有紫色光泽,可初步确定为可疑菌落。挑选可疑菌落接种于 BCYE 和血琼脂平板上,在 BCYE 平板生长,在血平板上不生长者,初步可认定为军团菌。

1.2.4 实时荧光 PCR 测定引物与探针 针对军团菌 5SrRNA 基因和嗜肺军团菌 mip 基因设计特异性引物和探针,由深圳生科源公司合成 5srRNA 序列 L5SL9 (5' - ACTATAGCGATTGGAACCA-3')和 L5SLR9 (5' - GCGATGACCTACTTTCGCAT-3') mip 序列 LmipL920(5' - GCTACAGACAAGGATAAGTTG-3')和 LmipR1548 (5' - GTTTTGTATACTTTAATTCA-3'),在反应体系中含有军团菌基因和嗜肺军团菌基因 DNA 模板的情况下,PCR 反应得以进行并释放荧光信号,利用仪器对 PCR 过程中相应通道的信号强度进行实时监测和输出,实现对军团菌、嗜肺军团菌的检测。

1.2.5 模板处理 刮取 GVPC 平板上的菌落放入含灭菌双蒸水的 eppendorf 管中混匀,室温静置 5min,取 1ml 上清液加入到 1.5ml 无菌离心管中,12 000rpm 离心 5min 后弃上清。每管沉淀中加入 DNA 提取液 50μl 将沉淀悬浮后 100℃ 沸水浴处理 5min。12 000rpm 离心 5min,取上清进行 PCR 检测。

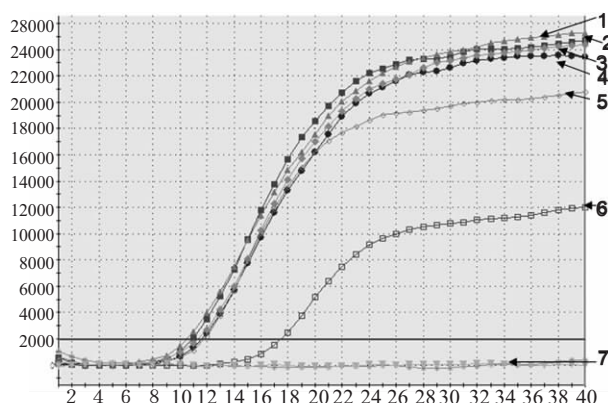
1.2.6 PCR 扩增 反应体系为 25μl,包括模板 DNA 5μl,实时荧光 PCR 反应液各 19.7μl,混合酶液 0.3μl (Taq 酶+UNG 酶)。反应条件为:UNG 处理 50℃ 2min,1 个循环;95℃ 3min 预变性,1 个循环;PCR 95℃ 5s,55℃ 1min 40 个循环。FAM 通道采集荧光信号。

1.2.7 结果判定 阳性标本检测结果 Ct 值≤30,有明显指数增长;对可疑标本 Ct 值在 30~35 范围,应对标本进行重复检测,如重复试验结果 Ct 值仍在 30~35 范围,有明显指数增长,则判定为阳性;否则为阴性。阴性标本检测结果 Ct 值>35 或无 Ct 线形为直线或轻微斜线,无明显指数增长期和平台期。

2 结果

2.1 各种水体军团菌的分离培养结果 共检测水样 243 份,其中有 49 份水样检出了嗜肺军团菌,检出率为 20.2%。检测冷却塔水及冷凝水 116 份,有 29 份水样检出了嗜肺军团菌,空调系统嗜肺军团菌总检出率为 25%。同时有 3 份水样(1 份淋浴热水,2 份冷却水)在 BCYE 平板上有可疑菌落生长,血平板上不生长,生化试验结果:氧化酶(-),硝酸盐还原(-),尿素酶(-),明胶液化(+),马尿酸盐(-),且嗜肺军团菌诊断血清(Lp1~Lp15)鉴定均不凝集。

2.2 实时荧光 PCR 结果 5SrRNA 是军团菌属共有基因,高度保守,其 rDNA 序列拷贝作为属检测依据非常可靠, mip 基因有足够的序列差异来区别嗜肺军团菌与非嗜肺军团菌。对上述分离培养出的 52 株菌株用荧光 PCR 技术进行检测,结果荧光 PCR 鉴定 52 株为军团菌菌株,鉴定 49 株为嗜肺军团菌菌株,鉴定上述 3 株可疑菌株是军团菌属,为非嗜肺军团菌,见图 1。



注:1~5 嗜肺军团菌株 6 阳性对照 7 阴性对照

Note:1~5 *Legionella pneumophila* 6 Positive control 7 Negative control

图 1 5 株嗜肺军团菌荧光 PCR 结果

Fig 1 The fluorescence PCR results of 5 *Legionella pneumophila* strains

2.3 军团菌种及血清型分布 52 株军团菌中有 49 株为嗜肺军团菌,占 94.2%,非嗜肺军团菌 3 株占(5.8%) 检出的军团菌以嗜肺军团菌为主。见表 1。

3 讨论

本次调查对 243 份深圳市环境中水源进行军团菌的检测,有 52 份水样检出军团菌阳性,军团菌总检出率为 21.4%,49 份水样检出了嗜肺军团菌,嗜肺军团菌总检出率为 20.2%;空调系统中有 28 份冷却水及 1 份冷凝水水样检出嗜肺军团菌,检出率分别为 31.1%(28/116)、3.9%(1/26),空调系统嗜肺军团菌总检出率为 25%,有 20 份宾馆淋浴热水检出嗜肺军团

菌,检出率为 23.3%,结果显示深圳市环境水源中军团菌污染主要分布于空调冷却塔水和宾馆淋浴热水中,不同水体类型中以冷却水水样军团菌检出率最高,达 33.3%(30/90)。此次二次供水、游泳池水、景观水池水均未检出军团菌,与国外的报道不同^[2],但并不代表军团菌不存在于这几种水体中,可能由于采样方法、采样量等其他原因造成^[2]。

本次在环境水源中检测出的 52 株军团菌,其中有 49 株为嗜肺军团菌,占 94.2%(49/52),非嗜肺军团菌 4 株占 7.7%(4/52)。军团菌菌型呈现多样化,除常见嗜肺军团菌 LP1 外,还有 LP3、LP5、LP6、LP7 和 LP10 型,深圳市环境水源嗜肺军团菌以 LP1 和 LP6 为优势菌型,占检出菌的 63.2%(31/49)和 22.5%(11/49),同时空调冷却水中有一份水样同时检出两种血清型 LP1 和 LP6,存在多种军团菌共存现象,这可能与空调冷却塔中

表 1 各种水体检出军团菌种及血清型分布情况

Table 1 Distribution and serotype of *Legionella* in every types of water samples

水样类型 Water type	嗜肺军团菌阳性数(株) No.strain positive for <i>Legionella pneumophila</i>							军团菌阳性数(株) No.strain positive for <i>Legionella</i>
	LP1	LP3	LP5	LP6	LP7	LP10	小计	
冷却水 Cooling tower water	18	1	1	6	1	1	28	30
冷凝水 Condensate water	1	0	0	0	0	0	1	1
淋浴热水 Shower warm water	13	2	0	5	0	0	20	21
二次供水 Secondary water supply	0	0	0	0	0	0	0	0
游泳池水 Water in swimming pools	0	0	0	0	0	0	0	0
景观池水 Landscape water	0	0	0	0	0	0	0	0
合计 Total	32	3	1	11	1	1	49	52

含有阿米巴等军团菌的天然宿主,这促进了冷却水中军团菌的多样性^[3]。LP1 血清型是引起人群军团菌病的主要病原体,空调冷却系统和宾馆客房淋浴热水内 LP1 型嗜肺军团菌生长繁殖达到一定浓度,即可引起人群感染军团菌病甚至暴发流行^[4],有关部门应密切监测其动态变化,建立预防预警机制^[5]。

针对本次调查所反映出来的情况,今后深圳市对军团菌人工水环境污染状况的监测重点放在空调冷却塔水和淋浴设施,以及其所产生的含有军团菌的气溶胶。定期对空调系统和淋浴系统进行军团菌的卫生监测,督促相关单位建立卫生管理制度,定期对空调系统和淋浴系统清洗消毒,对军团菌污染的控制从源头上把关^[6],以防止环境水源成为军团菌的传播源。

参考文献

[1] Guo CY, Ruan SY, Chen Y et al. Advances in Researches of Legionellae in environmental water systems [J]. Shanghai J Prev Med 2003, 15(4): 181-182. (In Chinese)
(郭常义,阮素云,陈悦,等.军团菌对人工水环境污染及预防的研究进展[J].上海预防医学杂志.2003, 15(4): 181-182.)
[2] Feng WR, Ma L, Liu HX et al. Survey and analysis of contamination status of water body with *Legionella pneumophila* in Guangzhou City

[J]. China Trop Med 2005, 5(1): 147-148. (In Chinese)
(冯文如,马林,刘汉湘,等.广州地区水体环境军团菌污染分布调查[J].中国热带医学,2005, 5(1): 147-148)
[3] Chen SS, Wang XC, Liu YL et al. Genetic Identification of Legionellae in Environmental Water Systems of Xinhui, Guangdong [J]. Practical Prev Med 2008, 15(6): 1687-1690. (In Chinese)
(陈珊珊,王晓春,刘元力,等.广东新会环境水源军团菌分布类型研究[J].实用预防医学,2008, 15(6): 1687-1690)
[4] Wang XY, Yu SY, Li SG et al. [J]. Legionellae contamination of ventilating air-condition system in hotels Shenzhen [J]. South China J Prev Med 2006, 32(3): 70-71. (In Chinese)
(王秀英,余淑苑,李思果,等.深圳市酒店集中空调通风系统军团菌污染情况调查与分析[J].华南预防医学,2006, 32(3): 70-71.)
[5] Zhang HM, Yang XC, Huo CY et al. Survey of transverse distribution of Legionellae in Qin huangdao City [J]. China Trop Med 2010, 10(1): 8-9. (In Chinese)
(张红梅,杨希存,霍长友,等.秦皇岛市首次军团菌横向分布调查[J].中国热带医学,2010, 10(1): 8-9.)
[6] Feng WR, Song H, Ma L et al. Analysis of factors influential on the contamination of Legionella in cooling tower water [J]. China tropical medicine, 2007, 7(8): 1470-1471. (In Chinese)
(冯文如,宋宏,马林,等.冷却塔水军团菌影响因素分析[J].中国热带医学,2007, 7(8): 1470-1471.)

收稿日期: 2012-02-24 编辑: 符式刚