



团 体 标 准

T/CITS 505—2025

水中嗜肺军团菌检验方法 酶底物法

Determination of *Legionella Pneumophila* for water—Enzyme substrate assay

2025-07-11 发布

2025-07-11 实施

中国检验检测学会 发布
中国标准出版社 出版

目 次

前言	III
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 方法原理	1
5 培养基与试剂	1
5.1 酶底物法培养基	1
5.2 预处理液的配制	2
5.3 硫代硫酸钠溶液的配制	2
5.4 BCYE 培养基	2
5.5 BCYE-cys 培养基	3
5.6 无菌水	3
5.7 标准菌株	3
6 仪器设备	3
7 样品的采集	3
7.1 采样瓶的准备与灭菌	3
7.2 样品采集	3
7.3 样品运输与保存	4
8 检验步骤	4
8.1 稀释	4
8.2 接种	4
8.3 培养	4
8.4 对照试验	4
9 检验结果	5
9.1 未检出	5
9.2 检出	5
9.3 菌型确定	5
10 质量控制	5
11 生物安全	5
附录 A(规范性) 96 孔定量盘 MPN 表	6
附录 B(资料性) 菌型确定	10

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。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由中国检验检测学会提出并归口。

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、北京市延庆区疾病预防控制中心、北京市朝阳区疾病预防控制中心、北京市门头沟区疾病预防控制中心。

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

水中嗜肺军团菌检验方法 酶底物法

1 范围

本文件描述了水中嗜肺军团菌酶底物检验法。

本文件适用于冷却水、冷凝水和生活用水(沐浴用水,生活热水)中嗜肺军团菌的检验。

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 5750.2 生活饮用水标准检验方法 第 2 部分:水样的采集与保存

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

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

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

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*

一种菌体大小为(0.3~0.4) μm \times (2~3) μm ,无荚膜,无芽孢,有端生鞭毛,革兰染色呈阴性,常呈梭形的杆菌。

3.2

最可能数 **most probable number;MPN**

一种采用稀释培养基于泊松分布的间接计数方法。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 1 000 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 五水硫代硫酸钠或 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	1 000 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 μ m 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 μ m 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 \pm 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 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℃。

5.4.2.6 无菌添加 L-半胱氨酸盐酸盐-水合物(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℃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

使用三级水,应符合 GB/T 6682 的要求,经 121℃高压灭菌 20 min 备用。

5.7 标准菌株

阳性对照标准菌株:嗜肺军团菌(CICC24883/ATCC33152 或其他同类菌株)。

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

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 1:1 000 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

采样时,应做好个人防护,采取无菌操作直接采集,不应用水样荡洗已灭菌的采样瓶或采样袋,并

避免手指和其他物品对瓶口或袋口的沾污。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。按照 GB/T 5750.2 的要求采集生活热水,采样时通常宜放水数分钟,排除沉积物,特殊情况可适当延长放水时间。每个样品取样 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 预处理液至无菌试管中。

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 $60\text{ s} \pm 5\text{ s}$,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。

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

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。

9.3 菌型确定

如需对嗜肺军团菌阳性结果进行菌型确定,可参考附录 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

嗜肺军团菌检验应根据 GB 19489 的要求,按照三类病原微生物进行管理。

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

表 A.1 96 孔定量盘 MPN 表 (续)

小孔阳性孔 穴数	大孔阳性孔穴数						
	0	1	2	3	4	5	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

表 A.1 96 孔定量盘 MPN 表 (续)

小孔阳性孔 穴数	大孔阳性孔穴数						
	0	1	2	3	4	5	6
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	1 017.6
79	85.9	101.0	122.5	155.8	214.4	346.3	1 061.6
80	87.1	102.4	124.3	158.1	217.8	352.6	1 109.7
81	88.3	103.8	126.0	160.5	221.2	359.1	1 162.9
82	89.5	105.2	127.8	162.8	224.6	365.6	1 222.4
83	90.7	106.7	129.6	165.2	228.1	372.1	1 289.8
84	91.9	108.1	131.4	167.5	231.6	378.8	1 367.7

表 A.1 96 孔定量盘 MPN 表 (续)

小孔阳性孔 穴数	大孔阳性孔穴数						
	0	1	2	3	4	5	6
85	93.1	109.5	133.2	169.9	235.1	385.6	1 459.8
86	94.3	111.0	135.0	172.3	238.6	392.4	1 572.5
87	95.5	112.4	136.8	174.7	242.2	399.4	1 717.8
88	96.7	113.9	138.6	177.1	245.8	406.4	1 922.6
89	97.9	115.3	140.4	179.5	249.4	413.6	2 272.6
90	99.1	116.8	142.2	181.9	253.0	420.8	>2 272.6

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 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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。
-

中国检验检测学会
团体标准
水中嗜肺军团菌检验方法 酶底物法
T/CITS 505—2025

*

中国标准出版社出版发行
北京市朝阳区和平里西街甲2号(100029)

网址 www.spc.net.cn

总编室:(010)68533533 发行中心:(010)51780238

读者服务部:(010)68523946

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

各地新华书店经销

*

开本 880×1230 1/16 印张 1.25 字数 21 千字
2025年11月第1版 2025年11月第1次印刷

*

书号:155066·5-17588 定价 38.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换

版权专有 侵权必究

举报电话:(010)68510107



T/CITS 505—2025