

· 临床研究 ·

Legiolert 酶底物法结合质谱法对环境样本水体中嗜肺军团菌定量检测分离

金萍, 葛藤, 叶艳华, 斯佳丽, 江晓, 张洪英
南京市疾病预防控制中心, 江苏 南京 210000

摘要: **目的** 探讨 Legiolert 酶底物法结合质谱法直接对环境样本水体中嗜肺军团菌定量检测分离的应用。**方法** 采集 2021 年 7 月至 11 月南京 14 家公共场所, 其中包括宾馆饭店、休闲中心等集中空调冷却水 18 份, 淋浴水 30 份等共计 48 份样本。利用 Legiolert 酶底物法直接对环境样本水体中嗜肺军团菌定量检测, 并对分离培养纯菌落结合质谱法, 荧光定量 PCR 试验确认后血清学分型, 与传统分离培养法相比较得出两种方法对环境样本的嗜肺军团菌检出率。**结果** 48 份样本两种方法嗜肺军团菌检出率分别为 8.33% (4/48)、31.25% (15/48), 两种检测方法差异有统计学意义 ($\chi^2 = 5.37, P < 0.05$)。**结论** Legiolert 酶底物法结合质谱法对环境样本水体中嗜肺军团菌检出率明显高于传统分离培养法。

关键词: Legiolert 酶底物法; 质谱法; 嗜肺军团菌; 定量检测分离

中图分类号: R126.4 **文献标识码:** B **文章编号:** 1674-8182(2023)02-0281-05

Quantitative detection and isolation of *Legionella pneumophila* in environmental water sample by Legiolert enzyme substrate method combined with mass spectrometry

JIN Ping, GE Teng, YE Yan-hua, SI Jia-li, JIANG Xiao, ZHANG Hong-ying

Nanjing Center for Disease Control and Prevention, Nanjing, Jiangsu 210000, China

Abstract: **Objective** To investigate the application of Legiolert enzyme-substrate method with mass spectrometry in direct quantitative detection and separation of *Legionella pneumophila* in environmental water samples. **Methods** Collection of 14 public places in Nanjing from July 2021 to November 2021, including hotels and restaurants, leisure centers and other centralized air conditioning cooling water 18, shower water 30 and other total 48 samples. Legiolert enzyme-substrate method was used to detect *Legionella pneumophila* in water samples, and the isolated cultured pure colonies were identified for serological typing with mass spectrometry and fluorescence quantitative PCR test. The detection rate of *Legionella pneumophila* was compared with that by traditional isolated and cultured method. **Results** The detection rates of *Legionella pneumophila* in 48 samples were 8.33% (4/48) by traditional method and 31.25% (15/48) by mass spectrometry and fluorescence quantitative PCR. There was a significantly difference in it between two detection methods ($\chi^2 = 5.37, P < 0.05$). **Conclusion** Legiolert enzyme-substrate method combined with mass spectrometry shows obviously higher positive detection rate of *Legionella pneumophila* in environmental water samples compared with the traditional isolation and cultivation.

Keywords: Legiolert enzyme-substrate method; Mass spectrometry; *Legionella pneumophila*; Quantitative detection and separation

Fund program: Nanjing Health Youth Talent Training Project (QRX11127)

空调通风系统清理不良易导致室内空气污染,长时间累积下来的卫生死角,微生物会不断滋生并通过四通八达的管网向室内广泛传播,甚至产成空气二次污染,由此导致的疾病可达数十种,其中由嗜肺军团菌所致的军团菌肺炎是一种病死率较高的急性呼吸系统病症^[1-2]。临床环境样本水体中军团菌检测的金标准——传统分离培养法,至今一直作为应用鉴别和诊断的重要标准依据^[3]。但其不足之处在于,细菌在培养过程中生长缓慢,分纯培养比较困难,极易被其他杂菌污染而出现假阴性。其培养时间最少1~2周,14 d以上才能报告结果,不仅费时费力,也很难满足临床快速诊断的要求,而且对实验人员的技能要求也较高。因此,临床上有必要发展一种特异、快捷、灵敏的军团菌检测新方法来达到快速实验诊断的要求^[4]。美国 IDEXX 公司近年发明一种可以定量检测嗜肺军团菌的方法——Legiolert 酶底物法,是基于细菌酶的检测技术嗜肺军团菌在富含氨基酸、维生素和其他适合其生长的营养素(Legiolert 试剂)环境中,迅速生长并繁殖,通过与试剂发生反应使溶液混浊或显褐色来显示嗜肺军团菌。目前北美、欧洲等相继对该方法进行了能力验证及应用,普遍认为酶底物法具有快速、易操作、高特异性的特点,适用于各类环境样本中嗜肺军团菌的检测^[5]。随着飞行质谱的快速发展,质谱分析技术愈加成熟,现已购置的安图 AUTOF MS1000 质谱仪,根据不同细菌所特有的蛋白,对纯培养后的菌落进行预处理,添加基质辅助细胞裂解,采用激光使细胞表面蛋白质结晶形成不同的模式峰,与数据库中的已知菌种图谱进行比较分析,可以快速得出目的菌鉴定结果。相对于全自动细菌鉴定仪来说,因其含有超大的数据库,可提供细菌属、种、株水平的鉴定,在临床上的检测应用和溯源分析越来越广泛,能够达到对常见病原菌快速鉴定的需求^[6]。基于此,本实验结合了 Legiolert 酶底物法和安图 AUTOF MS1000 全自动微生物质谱法,对南京市公共场所淋浴水及冷却水样本中嗜肺军团菌直接进行检测分离,并同时与 WS394-2012《公共场所集中空调通风系统卫生规范》附录 B 中传统分离培养法进行了比较,现将实验结果报告如下。

1 材料与方 法

1.1 样本来源 样本采集于 2021 年 7 月至 11 月南京 14 家公共场所,其中包括宾馆饭店、休闲中心等集中空调冷却水 18 份,淋浴水 30 份等共计 48 份样本。使用水样采集袋(无菌含 0.4% mg 硫代硫酸钠)(青

岛海博生物技术有限公司,产品编号:CYD005)按照无菌操作规程采集水样,每份 500 ml。

1.2 试剂与仪器

1.2.1 主要试剂 BCYE(202109003)和 L-半胱氨酸缺失的 BCYE(202109002)琼脂平板,GVPC 平板(202109001),无菌蒸馏水(202110008)均来源于欧克生物技术公司;嗜肺军团菌表型特征成套生化鉴定试剂盒(20210812)来源于上海科玛嘉生物有限公司;Legiolert 试剂(DT518)、预处理试剂(KS220)、Legiolert 定量盘(FT012),无菌水样瓶(100ML)均来源于 IDEXX 公司;LEGIONELLA LATEX TEST 军团菌诊断血清试剂盒(20200301)来源于天津生物芯片;嗜肺军团菌 ATCC33152 由江苏省疾病预防控制中心提供;嗜肺军团菌荧光定量 PCR 试剂盒(T202106146)由北京卓诚惠生生物科技提供;质谱样本(20201010)预处理试剂由安图生物提供。

1.2.2 主要仪器 Millpore 滤器过滤分析装置(密理博公司);Quanti-Tray Sealer PLUS 程控定量封口机(IDEXX);Heal Force 二氧化碳培养箱(上海力申科学仪器公司);电热恒温恒湿培养箱(上海博迅医疗生物仪器有限公司);AUTOF MS1000 全自动微生物质谱检测仪(郑州安图生物公司);7500 Fast 荧光定量 PCR 仪(ABI)。

1.3 方法

1.3.1 非饮用水样品 Legiolert 酶底物法 依据 D8429-21 美国材料与实验协会认证标准(ASTM)在不含硫代硫酸钠的无菌取样瓶中加入 100 ml 无菌水及一支 Legiolert 试剂,混匀。同时于另一无菌试管中加入 2 ml Legiolert 预处理液及 2 ml 待测冷却水样品,混匀。取试管内的 2 ml 样品混合液至含有 Legiolert 试剂的取样瓶中,混匀后倒入 Legiolert 定量盘中,轻拍定量盘以排出空气,并立即放入程控定量封口机内封口。同时做阳性对样品:取 ATCC 33125 军团菌标准菌株在 BCYE 平板上 2~3 个菌落加入 100 ml 无菌蒸馏水中,作为阳性加标水样;阴性对照样品即空白对照,加入一个 Legiolert 试剂到 100 ml 无菌蒸馏水即可。培养时定量盘孔格面朝上并保证培养箱内湿度达到 80%,待测水样和阴性空白对照于 37 ℃ 培养 7 d;阳性对照于 39 ℃ 培养 7 d。结果判定:相对阴性对照而言,定量盘孔格内显褐色或浊度大于空白对照均判断为嗜肺军团菌可疑阳性;颜色、浊度与空白对照无差异则为阴性。确认试验:将 Legiolert 酶底物法 7 d 培养后的定量盘纸板显褐色区域戳破,使用无菌注射器吸取一定量培养液在 BCYE 培养基上划

出率(31.25%)高于传统分离培养法(8.33%),差异有统计学意义($P < 0.05$, $\chi^2 = 5.37$)。

2.7 Legiolert 酶底物法定量结果与质谱分值区间统计 15份酶底物法阳性样本中,4份MPN值(/100 ml) > 100.0,11份MPN值(/100 ml) < 100.0,这11份样本其中有9份MPN值(/100 ml) < 30。质谱鉴定结果6份 > 9.0,9份6.0~9.0。见表2。

表1 传统法4份阳性样本酶底物定量质谱结果及血清型别
Tab. 1 Results of enzyme substrate quantitative mass spectrometry and serum types of 4 positive samples by traditional method

样本类型	酶底物法 MPN 值 (/100 ml)	质谱鉴定得分	血清学型别
淋浴水 1	156.6	9.351	LP1
淋浴水 2	141.6	9.287	LP1
冷却水 1	105.7	9.335	LP14
冷却水 2	119.8	9.215	菲氏

表2 15份阳性样本酶底物 MPN 值和质谱分值
Tab. 2 MPN values and mass spectrometry scores of enzyme substrates for 15 positive samples

样本类型	样本数	酶底物法 MPN 值 (/100 ml)			质谱鉴定得分	
		>100.0	30.0~100.0	<30.0	>9.0	6.0~9.0
淋浴水	9	2	1	6	4	5
冷却水	6	2	1	3	2	4
合计	15	4	2	9	6	9

3 讨论

本次14家公共场所集中空调冷却水18份,淋浴水30份等共计48份样本中,利用Legiolert酶底物法结合质谱法检出15例(31.25%)嗜肺军团菌阳性样本,其中空调冷却水6份,淋浴水9份。而传统分离培养法检出嗜肺军团菌阳性样本只有4份(8.33%),淋浴水和冷却水各2份。Legiolert酶底物法对公共场所水体样本中嗜肺军团菌的检测灵敏度高于传统分离培养法^[10]。符合湖北省十堰疾控的比较报道,传统培养法总体检出率低于Legiolert酶底物法对同一样品的检出率^[11]。在实验操作过程中由于抽滤装置滤器的消毒效果、恒温培养箱CO₂的实时浓度、酸处理的试剂浓度、样本中菌量较低,或在培养过程中被其他杂菌污染限制性抑制生长等原因,都可能造成传统分离培养法对嗜肺军团菌的漏检而出现假阴性,有报道传统分离培养法存在一定的假阴性率^[9]。而且此方法只能做到定性检测,不能得出样本中所含菌量多少,很难达到标准化量化的要求。

本文采用的Legiolert酶底物法定量检测水体中嗜肺军团菌是一种尚未入国标的新方法,依据D8429-21ASTM标准,计算定量盘上阳性大孔和小孔的数目,

从MPN表里查得样本中嗜肺军团菌含量的最接近数值,其最低检测限可以达到7d培养时间内能检测出至少1个嗜肺军团菌。不仅可以定量出样本中菌量数值,还由于检测方法的特异性可以抑制异样菌,不用担心杂菌的干扰,一定程度上克服了目的菌的漏检发生^[12]。本研究数据可以看出,此种方法检出的阳性样本15份,经分离纯培养后的质谱鉴定、荧光定量PCR试验、血清学分型,均得到较好的嗜肺军团菌确认结果,无1例假阳性,符合北京市延庆区疾控的验证确认试验报道,此方法特异度100%^[13]。传统法分离培养出的4份样本,其酶底物法MPN值(/100 ml) > 100.0,质谱鉴定得分也在9.0以上,显示出极好的鉴定结果。而Legiolert酶底物法检出嗜肺军团菌传统分离法未检出的11例,MPN值结果有9例为1~30,另2例结果36.1。可以分析出,样本中嗜肺军团菌含量MPN(/100 ml) < 30的情况下,由于菌量浓度较小,传统培养法检验操作环节复杂,步骤过程繁琐,检测灵敏度会降低,很难分离到目的菌,极易造成假阴性的发生。

Legiolert酶底物法结合质谱法对环境样本水体中嗜肺军团菌的检测效率优于传统标准方法,准确性、灵敏度、特异性、流程简易性,日检测量大大提高的同时,还可以快速定量出样本中嗜肺军团菌的含量^[14-15]。并且多种方法验证确认无假阳性,适用于公共场所环境样本的卫生监测。

利益冲突 无

参考文献

- [1] Weiss D, Boyd C, Rakeman JL, et al. A large community outbreak of legionnaires' disease associated with a cooling tower in New York City, 2015[J]. Public Health Rep, 2017, 132(2): 241-250.
- [2] Fields BS, Benson RF, Besser RE. Legionella and Legionnaires' disease: 25 years of investigation[J]. Clin Microbiol Rev, 2002, 15(3): 506-526.
- [3] 黄晨铭,张岚,张晓,等.生活饮用水中嗜肺军团菌的酶底物测定方法研究[J].给水排水,2021,57(5):21-26.
Huang CM, Zhang L, Zhang X, et al. Study on the determination method of enzyme substrate of Legionella pneumophila drinking water[J]. Water & Wastewater Eng, 2021, 57(5): 21-26.
- [4] Toolkit: developing a water management program to reduce Legionella growth and spread in buildings[EB/OL]. [2022-06-09] https://www.baidu.com/link?url=XBI2-5KuBZ6yP0YaWLu58GNN-J1kgERPIAGoAkpm3S_34uGcO73f0TA9JLbH2HSv3RsmPGV3cF_IP20xHUS_&wd=&eqid=9aee2fd60017ef22000000046399272d.
- [5] McDade JE. Legionella and the prevention of legionellosis[J]. Emerg Infect Dis, 2008, 14(6): 1006.

- [6] 黄丽月, 韦国文. 安图质谱仪与生化反应鉴定血液分离念珠状链杆菌的价值[J]. 医疗装备, 2021, 34(13): 61-63.
Huang LY, Wei GW. Identification of *Streptobacillus moniliformis* isolated from blood by AUTO mass spectrometry and biochemical reaction[J]. Med Equip, 2021, 34(13): 61-63.
- [7] 中华人民共和国卫生部. 公共场所集中空调通风系统卫生规范: WS 394-2012[S]. 北京: 中国标准出版社, 2013.
Ministry of Health of the People's Republic of China. Hygienic specification of central air conditioning ventilation system in public buildings: WS 394-2012[S]. Beijing: Standards Press of China, 2013.
- [8] 周妍妍, 南征, 闫东辉, 等. 3种方法鉴定气单胞菌临床分离株效果分析[J]. 疾病监测, 2019, 34(1): 70-75.
Zhou YY, Nan Z, Yan DH, et al. Comparison of three methods for identification of clinical isolates of *Aeromonas*[J]. Dis Surveillance, 2019, 34(1): 70-75.
- [9] 高艳, 李啸, 段杉, 等. 酶底物法与过滤培养法检测非饮用水中嗜肺军团菌的比较[J]. 净水技术, 2020, 39(8): 8-12.
Gao Y, Li X, Duan S, et al. Comparison of enzyme substrate and filter culture methods for determination of *Legionella pneumophila* in nonpotable water[J]. Water Purif Technol, 2020, 39(8): 8-12.
- [10] 孙宗科, 张伟, 陈西平. 应用飞行时间质谱仪快速鉴定细菌的初步研究[J]. 卫生研究, 2004, 33(5): 552-554.
Sun ZK, Zhang W, Chen XP. Matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry used to bacteria detection[J]. J Hyg Res, 2004, 33(5): 552-554.
- [11] 李艳丽, 杨康, 付磊, 等. Legiolert 酶底物法与传统培养法对公共场所水体样本中嗜肺军团菌检出结果的比较[J]. 公共卫生与预防医学, 2021, 32(1): 51-54.
Li YL, Yang K, Fu L, et al. Comparison of the Legiolert enzyme-substrate method and the conventional cultivation for the detection of *Legionella pneumophila* in water samples from public places[J]. J Public Heal Prev Med, 2021, 32(1): 51-54.
- [12] 杨琳. Colilert(科立得)固定底物技术酶底物法的快速检测方法分析[J]. 大众科技, 2012, 14(4): 131-132.
Yang L. Fast detection method analysis of colilert fixed substrate technology enzyme substrate method[J]. Pop Sci & Technol, 2012, 14(4): 131-132.
- [13] 任淑敏, 赵璐, 刘凡, 等. 酶底物法定量检测嗜肺军团菌的应用研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2022, 32(1): 39-41.
Ren SM, Zhao L, Liu F, et al. Applied research on enzyme substrate method in quantitative detection of *Legionella pneumophila*[J]. Chin J Heal Lab Technol, 2022, 32(1): 39-41.
- [14] 付喜梅, 黄庆华, 俞秋华. 两种检测嗜肺军团菌方法的对比[J]. 生物化工, 2020, 6(3): 97-98, 104.
Fu XM, Huang QH, Yu QH. Comparison of two methods for detecting *Legionella pneumophila*[J]. Biol Chem Eng, 2020, 6(3): 97-98, 104.
- [15] 陈志永, 陈小岳, 黎俊宏, 等. 常州市 22 家宾馆集中空调水系统及淋浴水嗜肺军团菌污染状况分析[J]. 现代预防医学, 2017, 44(15): 2865-2868.
Chen ZY, Chen XY, Li JH, et al. Status of *Legionella Pneumophila* contamination in central air conditioning water systems and shower water in 22 hotels, Changzhou[J]. Mod Prev Med, 2017, 44(15): 2865-2868.

收稿日期: 2022-06-09 编辑: 王娜娜

(上接第 280 页)

- [13] Hirata K, Miyamoto-Mikami E, Kanehisa H, et al. Muscle-specific acute changes in passive stiffness of human triceps surae after stretching[J]. Eur J Appl Physiol, 2016, 116(5): 911-918.
- [14] 井兰香, 赵延治. 超等长阻力训练对足踝屈肌肌构筑学及生物力学特征影响的研究[J]. 山东体育学院学报, 2021, 37(1): 38-47.
Jing LX, Zhao YZ. Effects of plyometric resistance training on flexors' muscle architecture and their biomechanics in foot & ankle[J]. J Shandong Sport Univ, 2021, 37(1): 38-47.
- [15] Finni T, Cronin NJ, Mayfield D, et al. Effects of muscle activation on shear between human soleus and gastrocnemius muscles[J]. Scand J Med Sci Sports, 2017, 27(1): 26-34.
- [16] Liu CL, Zhou JP, Sun PT, et al. Influence of different knee and ankle ranges of motion on the elasticity of triceps surae muscles, Achilles tendon, and plantar fascia[J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 6643.
- [17] Pinel S, Kelp NY, Bugeja JM, et al. Quantity versus quality: age-related differences in muscle volume, intramuscular fat, and mechanical properties in the triceps surae[J]. Exp Gerontol, 2021, 156: 111594.
- [18] Machado E, Lanferdini FJ, da Silva ES, et al. Triceps surae muscle-tendon properties as determinants of the metabolic cost in trained long-distance runners[J]. Front Physiol, 2022, 12: 767445.
- [19] Chino K, Kawakami Y, Takahashi H. Tissue elasticity of in vivo skeletal muscles measured in the transverse and longitudinal planes using shear wave elastography[J]. Clin Physiol Funct Imaging, 2017, 37(4): 394-399.

收稿日期: 2022-05-17 修回日期: 2022-07-13 编辑: 王宇