

## 医院水环境军团菌污染及住院肺炎病例军团菌感染来源调查

张琦，陈茸，张稷，严洁，张旭辉，周伟杰

214023 无锡市疾病预防控制中心（张琦、陈茸、张旭辉、周伟杰）；无锡市人民医院（张稷、严洁）

**【摘要】目的** 了解医院水环境军团菌污染及住院肺炎病例军团菌感染来源。**方法** 采集医院冷却塔水和管网末梢水共 24 件，进行军团菌分离培养。对 90 例住院肺炎病例进行问卷调查、深部痰液军团菌培养和荧光定量 PCR 检测、军团菌尿抗原和血抗体检测，明确军团菌发病情况及类型。对分离环境菌株和病人菌株进行了 PFGE 和 SBT 检测，进行病原体溯源。**结果** 医院冷却塔水军团菌阳性率 100%（5/5），其中有 2 份水样军团菌浓度大于  $10^3$ cfu/L；管网末梢水军团菌阳性率 21.1%（4/19），其中有 3 份水样军团菌浓度大于  $10^3$ cfu/L。余氯量平均 0.03mg/L，污染军团菌血清型 LP1、LP6。住院肺炎病例中军团菌肺炎阳性率 15.6%（14/90），其中痰培养和 PCR 同时阳性 1 例、尿抗原阳性 13 例，社区获得性军团菌肺炎 16.4%（11/67）、医院获得性军团菌肺炎 20.0%（3/15）。分离环境与病人菌株血清型别和 PFGE 图谱分析均不一致，未能溯源。**结论** 医院水环境军团菌污染严重且污染浓度高，余氯浓度低于标准，存在发生医院内军团菌肺炎甚至暴发流行的严重隐患。建议定期监测医院水环境军团菌，对医院肺炎病人进行军团菌病相关检测，并研究具有可行性的消毒措施去除军团菌污染。

**【关键词】** 军团菌；医院；冷却塔水；供水系统；医院获得性军团菌病  
**Contamination status of legionella in Hospital water environment and traceability**

**investigation of legionella infection in hospital pneumonia cases**

ZHANG Qi \*, CHEN Rong, YAN Jie, ZHANG Ji, ZHANG Xu-hui, ZHOU Wei-jie

\*Wuxi Center for Disease Control and Prevention, Wuxi 214023, China

**【Abstract】Objective** To investigate the Contamination status of legionella in Hospital water environment and traceability investigation of legionella infection in hospital pneumonia

Corresponding author: ZHOU Wei-jie i, Email: wxcdczwj@163.com

作者简介：张琦（1984 年-）、女、江苏无锡、硕士、主管医师，研究方向：环境与健康

通信作者：周伟杰，Email: wxcdczwj@163.com

基金项目：无锡市科技局科技支撑计划社会发展项目（CSE01N1230）

cases. **Methods** 24 Cooling tower water and pipe network peripheral water samples of hospital were collected. The water samples were cultured for legionella. To know the situation and types of legionella infection, we survey 90 hospital pneumonia cases. Implementation of the questionnaire, deep sputum cultures and fluorescence quantitative PCR detection of legionella, urinary Antigen and serum antibody detection of legionella. To learn the source of legionella infection, the legionella strains which isolated from environment and cases were tested by the way of PFGE and SBT. **Results** The legionella positive rate of Cooling tower water was 100%(5/5), and 2 samples' legionella count were greater than  $10^3$ cfu/L. The legionella positive rate of pipe network peripheral water samples of hospital was 21.1% (4/19), and 3 samples' legionella count were more than  $10^3$ cfu/L. The average of residual chlorine in water was 0.03 mg/L. Legionella pollution serotypes were LP1, LP6. 15.6% (14/90) hospital pneumonia cases were infected by legionella. One case was positive by sputum culturing and PCR testing. 13 cases were positive by urinary antigen testing. 16.4% (11/67) was CALs, 20.0% (3/15) was HALs. The strains separated from environment and patients, which spectrum and PFGE serotype were inconsistent. So, the source of legionella infection was unclear. **Conclusion** The investigated hospital have high levels contamination and high concentration of legionella, have lower residual chlorine concentration than the standard, which would likely to acquire legionellosis. We suggest regular monitoring legionella in hospital water environment, conduct Legionella disease related detection for hospital pneumonia cases, and disinfection of the water systems should be considered.

**【Key words】** Legionella; Hospital; Cooling tower water; Water supply system; Hospital-acquired legionella disease

军团菌病按照获得性感染的来源不同, 可以分为社区获得性军团菌病 (Community acquired legionellosis, CALs)、医院获得性军团菌病 (Hospital acquired legionellosis, HALs) 和旅行相关性军团菌病 (Travel associated legionellosis, TALs)。欧洲军团菌工作组 (The European working group for Legionella infections, EWGLI) 报告 2007-2008 年共 11867 例军团菌病, 其中 HALs 为 748 例占 6.3%<sup>[1]</sup>。HALs 病死率较高 14%-40%, 且可出现暴发流行, 在国外广受重视。研究数据显示, 军团菌广泛存在于各类人工水环境中,

CALs 最主要的污染源是空调冷却塔水<sup>[2]</sup>，而 HALs 主要来源是受污染的供水系统<sup>[3-4]</sup>。文献显示 60-85% 的医院供水系统有军团菌的定植<sup>[5-6]</sup>，很多国家规定对医院供水系统和肺炎病例进行军团菌相关的常规监测，而我国相关报道较少。为了了解医院水环境军团菌污染状况并对住院肺炎病例军团菌感染来源溯源，笔者于 2012 年 9 月至 2014 年 4 月对 A 医院水环境和肺炎病人开展军团菌相关检测，现将结果报道如下。

## 1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂：余氯检测仪、恒温 CO<sub>2</sub> 培养箱 Hera、军团菌培养基 Oxiod、军团菌乳胶凝集试剂盒 Oxiod，军团菌分型血清凝集试剂盒日本生研、基因组 DNA 提取试剂盒德国 Qiagen、PCR 反应试剂大连宝生物工程、军团菌的特异性引物和探针由上海生工合成、荧光定量 PCR 仪、PTC-200 型 PCR 仪、Gel Doc2000 型凝胶成像系统、CHEF-DRIII 电泳仪、bioMérieux Densimat 比浊仪、EPS300 型琼脂糖凝胶电泳仪 Bio-Rad、Asc I 内切酶 NEB、Trypsin-EDTA 消化液 Sigma、DAI 嗜肺军团菌 (*Legionella pneumophila*, LP) 尿抗原检测试剂盒、Binax NOW LP1 型尿抗原检测试剂盒、军团菌 IgG/A/M 血抗体检测试剂盒。

1.2 医院水样采集及培养法检测：于 2012 年 9 月对 A 医院(三甲医院)水环境军团菌污染状况进行摸底，使用装有少量硫代硫酸钠的无菌玻璃瓶，采集冷却塔水和管网末梢水每份 500ml，同时记录余氯量和水温。冷却塔水，于液面下 10cm 处采集澄清样品，依据冷却塔大小每塔采集 1-2 件样品，共采样 5 件。管网末梢水，水龙头打开后即刻采样，共采集 19 件，其中普通病房 13 件、ICU2 件、手术室 2 件、办公室 1 件和消毒供应室 1 件。此后至 2014 年 3 月，每半年采集冷却水 1 件，病房管网末梢水 13 件进行环境监测，共 4 次。所有水样参照 ISO 11731<sup>[7]</sup>进行军团菌分离培养，分离到的菌株首先使用军团菌乳胶凝集试剂盒进行初步鉴定，可初步分型为 LP1、LP2-14 及非嗜肺军团菌，再使用军团菌分型血清凝集试剂盒进行血清分型。军团菌计数方法如下：

$$C=(n \times v/i) \times 1/s$$

C=样本中每升的菌落数(cfu/L)

n=平板上的军团菌菌落数

v=滤膜洗脱液的液体量(ml)

i=接种于 GVPC 平板上的滤膜洗脱液量(ml)

s=样本水样的体积(L)

注：平板上的军团菌菌落数 n 以生长最多的一块 GVPC 平板的菌落数表示。

1.3 住院肺炎病例军团菌感染筛查：针对 A 医院，于 2012 年 11 月至 2013 年 3 月调查 ICU 肺炎病人 40 例，2013 年 9 月至 2014 年 4 月调查呼吸科住院肺炎病人 50 例。调查内容①问卷调查②采集深部痰液，进行军团菌分离培养和荧光定量 PCR<sup>[8]</sup>检测③采集中断晨尿 15ml，分别使用 DAI 嗜肺军团菌和 Binax NOW LP1 两种尿抗原试剂盒检测④采集急性期、恢复期双份静脉非抗凝血各 3ml，3000r/min 离心 15min 分离血清，使用军团菌 IgG/A/M 试剂盒检测血抗体。军团菌肺炎判定标准，有临床症状、X 线提示肺炎且同时满足以下条件之一①深部痰液培养阳性或②深部痰液 PCR 阳性或③尿抗原阳性或④双份血清抗体滴度升高 $\geq 4$  倍。按发病时间判定病例类型为，社区获得性（症状发生前 10 天未到过医院）、疑似医院获得性（住院 2-9 天发病）和医院获得性（住院 $\geq 10$  天后发病）。

1.4 军团菌感染分子溯源检测：对从环境和病人分离到的军团菌菌株进行脉冲场凝胶电泳（Pulse field gel electrophoresis, PFGE）进行溯源，同时对病人分离株进行多位点序列分型（sequence-based typing, SBT）。

①PFGE，参照文献<sup>[9]</sup>建立的嗜肺军团菌 PFGE 分型标准化方案进行实验，根据每 2 个图像之间的相似性系数，用非加权配对算术平均法（unweighted pair group average method, UPGMA）进行聚类，构建聚类树。②SBT，实验方案参照 EWGLI 发布嗜肺军团菌 SBT 标准方法（4.2 版本），对 flaA, pile, asd, mip, mompS, proA, neuA 等 7 个基因位点进行 PCR 扩增，产物纯化后用 ABI 3730 基因分析仪进行序列测定并提交至 SBT 数据库（www.ewgli.org）进行比对，获得该菌株的 ST 型。

## 2 结果

2.1 医院水环境军团菌污染状况：2012 年 9 月初步摸底调查，采集水样 24 份。冷却塔水 5 件，军团菌阳性率 100%（5/5），浓度分别是 350cfu/L、450cfu/L、500cfu/L、 $2.3 \times 10^3$ cfu/L、 $3.1 \times 10^3$ cfu/L，军团菌血清型为 LP1 和 LP6。管网末梢水 19 件，军团菌阳性率 21.1%（4/19），普通病房、

ICU 病房、手术室和消毒供应室有阳性检出，浓度分别为 150cfu/L、 $2.5\times10^4$ cfu/L、 $5.8\times10^3$ cfu/L、 $2.9\times10^3$ cfu/L，污染军团菌血清型为 LP1。24 件样品，水温 24.8℃~39.7℃、平均 29.9℃，余氯量 0.00mg/L~0.09mg/L、平均 0.03mg/L。后续每半年一次环境监测共 4 次，每次冷却水均为阳性 LP1、LP6 污染，管网末梢水未检出。

2.2 住院肺炎病例军团菌感染筛查结果：共调查 A 医院 90 位住院肺炎病人，ICU 病房 40 例、呼吸科病房 50 例，男性 53 例，女性 37 例，年龄 14 岁~88 岁，平均 54 岁，问卷、尿样、深部痰液和急性期血样获取率均为 100%，恢复期血样回收率较低血清检测结果不能用于诊断。按照方法中的判定标准，住院肺炎病例中军团菌肺炎阳性率 15.6%（14/90），其中痰培养和 PCR 同时阳性 1 例，仅尿抗原阳性 13 例，均为非 LP1 型感染，具体各指标检测结果见表 1。此外根据病例类型分组，本调查社区获得性肺炎 67 例、疑似医院获得性肺炎 8 例、医院获得性肺炎 15 例，军团菌检出率见表 1。

表 1 住院肺炎病例军团菌感染情况

检测指标	阳性率	肺炎病例类型	军团菌肺炎发病率
痰培养 <sup>a</sup>	1.1%（1/90）	社区获得性	16.4%（11/67）
痰荧光定量 PCR	1.1%（1/90）	疑似医院获得性	0.0%（0/8）
尿抗原（总 LP）	14.4%（13/90）	医院获得性 <sup>b</sup>	20.0%（3/15）
尿抗原（LP1）	0.0%（0/90）	合计	15.6%（14/90）
血抗体 IgG/A/M	16.7%（15/90）		

a. 培养得到军团菌血清型为 LP5、LP10 双重感染

b. 3 个医院获得性军团菌肺炎病例均使用过呼吸机

2.3 军团菌感染分子溯源检测结果：本次调查仅发现 1 例病原学培养阳性医院获得性病例，且感染型别为 LP5 和 LP10，于医院环境中分离菌株 LP1、LP6 型别不一致，此外还针对该病例进行的个案调查，采集病人接触过的其他可疑水样（呼吸机、家中）均未检出军团菌，最终未能明确污染来源。虽然如此，仍对分离到的 11 株医院环境菌株和 9 株肺炎病人菌株（来源于一个病人）进行了 PFGE 检测，结果 6 个 LP1 环境株 5 种带型，5 个 LP6 环境株 3 种带型，4 个 LP10 肺炎病人株同一带型，5 个 LP5 肺炎病人株同一带型，详见图 1。选择肺炎病人军团菌分离株 LP10 和 LP5 各一株进行 SBT 检测，测得序列提交

EWGLI 网站，经审核为新的基因型被命名为 ST1439 和 ST1440，两者仅 mip 和 proA 位点存在差异，详见表 2。

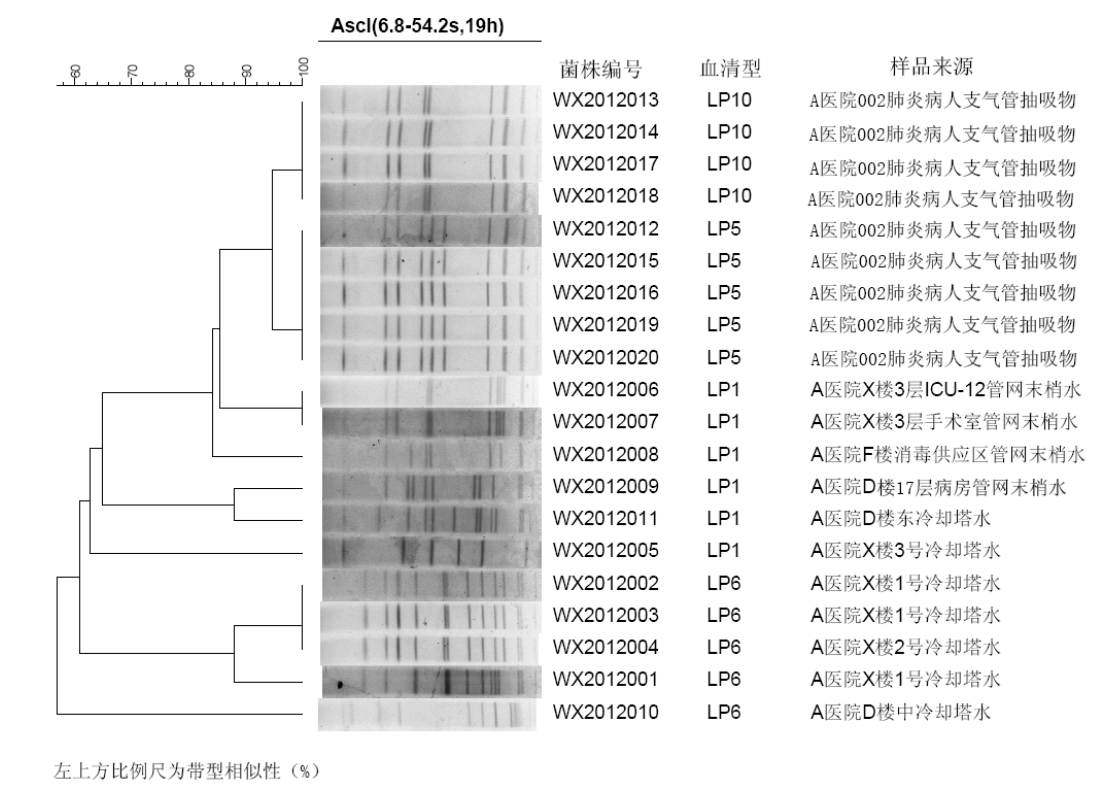


图 1 A 医院环境与病人分离军团菌菌株 PFGE 聚类图

表 A 医院某肺炎病人支气管抽吸物分离军团菌菌株 SBT 分型

菌株编号	血清型	flaA	pilE	asd	mip	mompS	proA	neuA	ST 型
2012012	LP5	6	10	15	28	21	7	207	ST-1439
2012013	LP10	6	10	15	10	21	40	207	ST-1440

3 讨论

军团菌作为医院获得性肺炎的主要病原体，其主要污染来源是医院供水系统。国际上许多国家对医院建筑物军团菌环境检测，做了详细的规定和建议。欧盟 EWGLI，建议医院及大型建筑物的冷却塔水和冷热水供水系统常规检测军团菌。世界卫生组织 WHO，2004 年将军团菌列入医院饮用水常规检测项目。2003 年美国 CDC 关于医院获得性军团菌病防控指南规定，①针对无 HALs 医院定期常规监测供水系统军团菌，任一样品阳性对所有医院获得性肺炎病人进行军团菌病检测，当≥30%环境样品阳性时发生 HALs 的风险增高<sup>[4]</sup>，应对供水系

统进行消毒；②明确发现有 HALs 医院，应对环境和医院获得性肺炎病人同时进行军团菌相关检测，对供水系统进行消毒处理。

本次调查 A 医院冷却塔水军团菌阳性率 100%，高于湖南李四海 30 家医院冷却塔水军团菌阳性率 59.38%<sup>[10]</sup>的报道，其中有 2 份水样军团菌浓度大于  $10^3$ cfu/L；管网末梢水军团菌阳性率 21.1%（4/19），其中有 3 份水样军团菌浓度大于  $10^3$ cfu/L，污染血清型 LP1、LP6，当水体中军团菌污染浓度  $\geq 10^3$  cfu/L 时较易发生军团菌病<sup>[11]</sup>，说明了医院环境军团菌污染的严重性。此外调查发现该医院未对供水系统进行常规消毒，检测水样余氯量平均 0.03mg/L 不满足国家标准，不能有效控制水中微生物生长繁殖。

鉴于本次调查结果，建议①常规定期进行医院水环境军团菌检测②环境军团菌阳性医院，应对院内获得性肺炎病例和高度可疑病人开展军团菌感染相关检测③加强军团菌病的知识宣传，提高医务工作者对军团菌病的了解，早发现早诊断。④选择适当的措施对供水系统进行定期消毒，铜银离子法、二氧化氯消毒等⑤ 当  $\geq 30\%$  环境样品检出军团菌或军团菌浓度  $\geq 10^3$  cfu/L 或发现 HALs 时，立即采取应急消毒措施，热水流放法（水箱水保持 70℃ 以上，流放 30min，流放时管网末梢水保持在 60–65℃）。

### 参考文献

- [1]Joseph CA, Ricketts KD. European Working Group for Legionella Infections. Legionnaires' disease in Europe 2007–2008[J]. Euro Surveill, 2010, 15(8): 19493.
- [2]Christine Campese, Dounia Bitar, Sophie Jarraud, et al. Progress in the surveillance and control of Legionella infection in France, 1998 – 2008[J]. [International Journal of Infectious Diseases](#), 2011, 15(2): 30 – 37.
- [3]Ricketts KD, Joseph CA. European Working Group for Legionella Infections. Legionnaires' disease in Europe 2003–2004[J]. Euro Surveill, 2005, 10(12): 256–259.
- [4]Stout JE, Muder RR, et al. Role of environment surveillance in determining the risk of hospital-acquired legionellosis: a national

surveillance study with clinical correlations[J]. Infect Control Hosp Epidemiol, 2007, 28(7):818-824.

[5]Lasheras, Boulestrean H, Rogues AM, et al. Influence of Amoebae and physical and chemical characteristics of water on the presence and proliferation of legionella species in hospital water systems[J]. Am J Infect Control 2006, 34(8): 520-525.

[6]Yu PY, Lin YE, Lin WR, et al. The high prevalence of legionella pneumophila contamination in hospital potable water systems in Taiwan: implications for hospital infection control in Asia[J]. Int J Infect Dis, 2008, 12(4): 416-420.

[7]International Organization for Standardization. Water Quality—Detection and Enumeration of Legionella: International Organization for Standardization, 1998, 1-16.

[8] 秦天, 胡光春, 任红宇, 朱兵清, 刘尊玉, 邵祝军. TaqMan 荧光 PCR 检测军团菌方法的建立及应用[J]. 中华预防医学杂志, 2011, 5:444-447.

[9]秦天, 任红宇, 周海健, 朱兵清, 崔志刚, 邵祝军. 中国嗜肺军团菌分离株脉冲场凝胶电泳分型分析以及数据库的建立[J]. 中华流行病学志, 2011, 3:273-277.

[10]李四海, 黄涛, 吴传业, 庞浩, 杨新文. 湖南省医院集中空调通风系统卫生现状与管理对策探讨[J]. 实用预防医学, 2009, 2(16): 370-371.

[11]Sehulster L, Chinn RY. Guidelines for Environmental Infection Control in Health-Care Facilities[J]. MMWR Recomm. Ref. 2003, 52(10): 1-42.