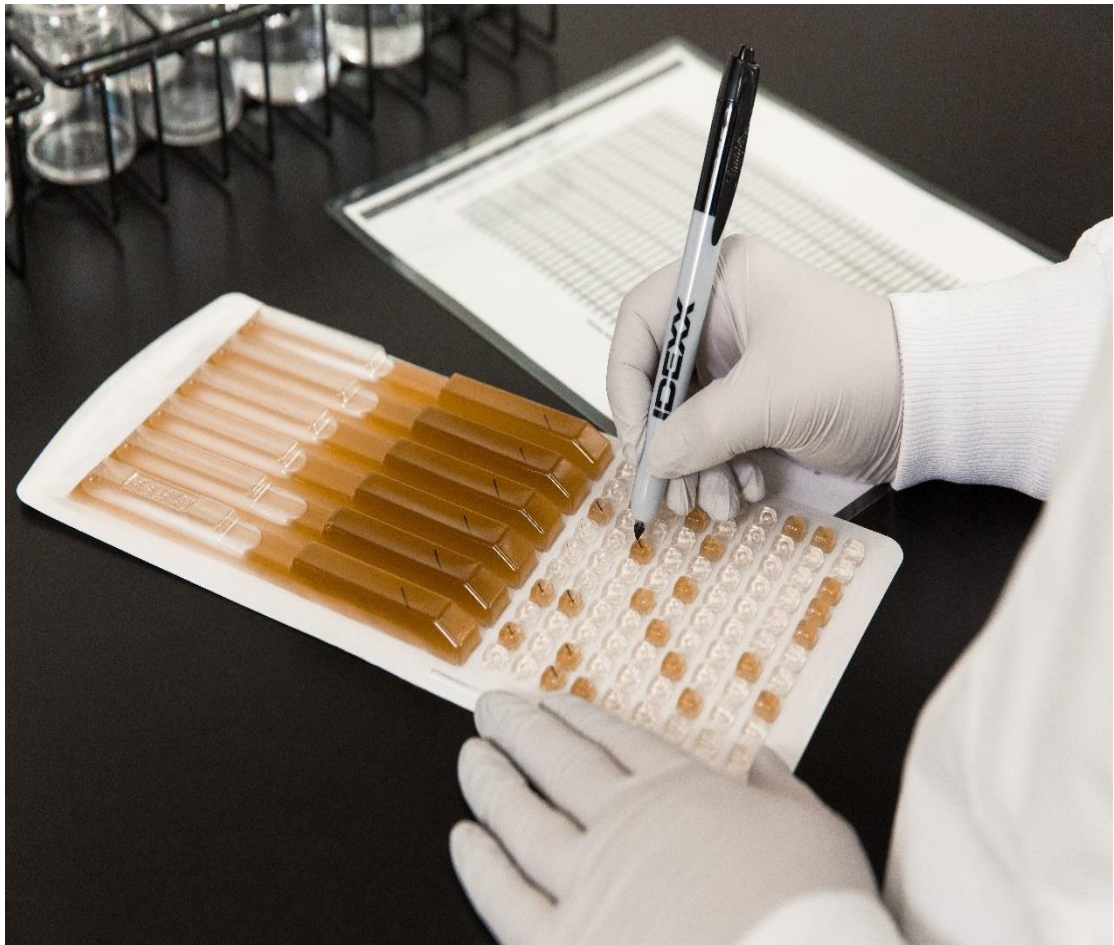


Legiolert 检测嗜肺军团菌

操作规范



2024 版

目录:

一、Legiolert 检测嗜肺军团菌产品名称	3
二、实验室需要准备其他设备和耗材	4
三、阴性对照实验	5
四、阳性加标实验或能力验证 PT 步骤	6
五、非饮用水样品中嗜肺军团菌检测操作	8
六、饮用水样品中嗜肺军团菌检测操作	10
七、附录	
1. MPN 表	12
2. Pretreatment 预处理套装说明书	15
3. Legiolert 补充剂套装说明书	15
4. 常见问题解答	16
5. 质量控制过程	22
6. 如何做菌种鉴定实验(选做)(中英文)	23

一、 Legiolert 检测嗜肺军团菌产品名称

产品	货号	图片
Legiolert 试剂	WLGT-100	
Legiolert 96 孔定量盘	WQTLGT-100	
无菌取样瓶 (不含硫代硫酸钠)	WV120SB-200	
预处理套装 (非饮用水样品使用) 淋浴水、空调冷凝水、冷却水 样品使用	WLGT-PRE	
补充剂套装 (饮用水样品使用) 出厂水、管网水、二次供水使用	WLGT-SUP	
Legiolert 定量盘橡胶衬垫	WPLUSRBR-LGT	
Quanti-tray Sealerplus 程控 定量封口机	WQTSPLUS	

二、 实验室需要准备其他设备和耗材

1. 无菌纯水（去离子水高压灭菌）500mL
2. 5 或 10mL 无菌带盖试管或离心管
3. 溶解“预处理液”（Legiolert Pretreatment）（非饮用水样品用）[见第 15 页](#)
4. 溶解“补充剂试剂”（Legiolert Supportment）（饮用水水样用）[见第 15 页](#)
5. 涡旋混合器（用于样品混匀、试剂混匀）
6. 计时器
7. 移液枪及枪头（1mL、10mL）
8. 无盖托盘，用于盛放水保障培养箱内湿度达 80%
9. MPN 表（见附录第 12 页）

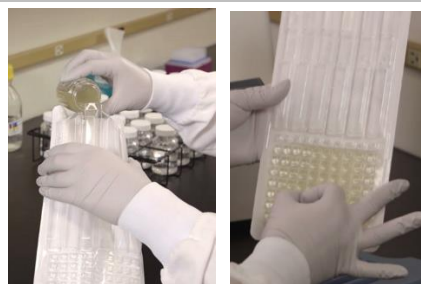
三、 阴性对照实验

阴性对照，建议每一批水样做一个阴性对照。

第一步：加入一个 Legiolert 试剂到 100mL 无菌纯水中。盖上瓶盖，摇匀直至试剂完全溶解。样品或许会保持浑浊状。



第二步：将上述处理好的样品全部倒入 Legiolert 96 孔定量盘中。轻拍或轻弹定量盘，以排出空气。



第三步：立即放入 Quanti-tray Sealerplus 程控定量封口机中封口。



第四步：培养 96 孔定量盘。
在 $37^{\circ}\text{C}\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 或 $39^{\circ}\text{C}\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 的温度下 (同水样培养一个温度即可)，培养 7 天。
(在培养箱内放入一个托盘，内放入一定体积的水，保证培养箱内湿度达 80%)。
培养时必须将定量盘纸片一面朝下，孔格一面朝上，最大限度的减少液体损失。



四、 阳性加标实验或 PT 能力验证步骤

使用嗜肺军团菌菌株，做阳性加标实验。

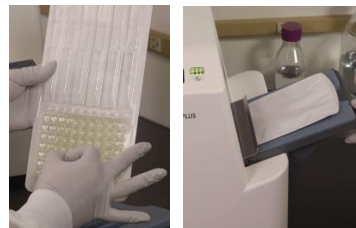
注：如果使用实验室标准菌株、质控样品或保存的工作菌株，则不可用再添加“预处理液 Legiolert Pretreatment”或“补充剂 Legiolert supportment”。因为标准菌株或质控样品中的嗜肺军团菌与环境中的菌不同，对于“补充剂”或“预处理液”不耐受，如添加了，则结果会偏低。

第一步：将一些阳性菌加入 100mL 无菌去离子水中待用，作为阳性水样。

第二步：加入一个 Legiolert 试剂到阳性样品中，盖上瓶盖，摇匀直至试剂完全溶解。样品或许会保持浑浊状。

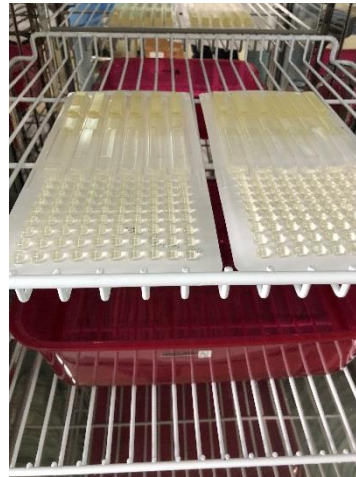


第三步：将上述处理好的样品全部倒入 Legiolert 96 孔定量盘中。轻拍或轻弹定量盘，以排出空气，立即放入 Quanti-tray Sealerplus 程控定量封口机中封口。



第四步：培养96孔定量盘

对于标准菌株、质量控制样品 (QC) 或能力验证 (PT) 样品，在 $39^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 的温度下，培养7天（在培养箱内放入一个托盘，内放入一定体积的水，保证培养箱内湿度达80%）。培养时必须将定量盘纸片一面朝下，孔格一面朝上，最大限度的减少液体损失。



第五步：根据下面的结果判读表读取结果。数出显阳性的孔格，对照MPN表得到结果。如果有稀释请在结果后乘以相应的稀释倍数。

结果判读

外观	结果
相对阴性对照而言，无论浑浊与否，任何显褐色的迹象	嗜肺军团菌为阳性
相对阴性对照而言，无论是否显褐色，浊度大于阴性对照	嗜肺军团菌为阳性
如颜色与浊度方面，与阴性对照无差异	嗜肺军团菌为阴性

- Legiolert试剂的培养时间为7日。在7日培养内出现的阳性结果和7日后显示的阴性检测结果均有效。
- 仅发生浑浊度变化表示嗜肺军团菌在生长，但指示剂还没有很强或很快的显露出来。

过程需注意：

- Legiolert试剂仅可用于澄清水样的检测，不可用于富集水或浓缩水。
- Legiolert操作过程应确保无菌环境，依据当地监管方针，处理所有实验样品与物料。



图：左边为阴性对照结果，右边为阳性加标结果

五、 非饮用水样品：嗜肺军团菌检测步骤

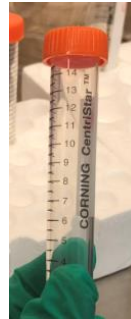
该操作适用于淋浴水、冷凝水、冷却水、水源水、泳池水等样品。但是出厂水、管网水、二次供水样品检测请参见 六、饮用水样品：嗜肺军团菌检测步骤。

操作视频：<http://www.gbmicrotest.com/legiolert.html> “使用方法/问题&解答”

第一步：100mL 无菌水加入到不含硫代硫酸钠的无菌瓶（货号：WV120SB-200）中。再加入一个 Legiolert 试剂，盖瓶盖摇匀即获得一瓶**液体培养基**。混合液或许会保持浑浊状。置于一旁待用。



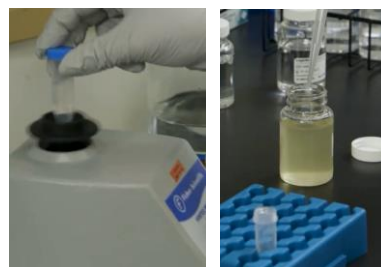
第二步：实验室准备一个 5 或 10mL 带盖无菌试管。加入 2.0mL Legiolert 预处理液（Pretreatment）到无菌试管中。
注：预处理套装 Pretreatment（货号：WLGT-PRE）配制见附录，第 15 页。



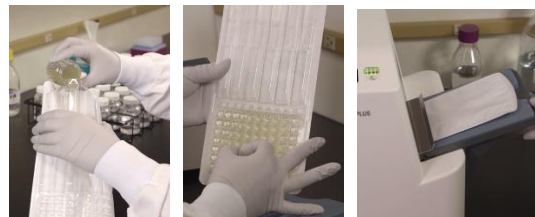
第三步：取 2.0ml 水样添加至第二步同一试管中，混匀。置于室温 60 秒（ ± 5 秒）。
注：水样与预处理混合即开始计时。总时长为 60 秒 ± 5 秒。



第四步：60 秒结束前，再混合 5 秒试管内液体，并立即从试管中取出 2.0mL 混合液到**第一步的液体培养基**（即 100mL 无菌水+Legiolert 试剂）中。

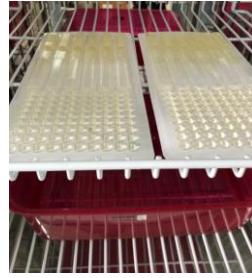


第五步：将第四步混匀后的液体，全部倒入 Legiolert 96 孔定量盘中。轻拍或轻弹定量盘，以排出空气。放入 Quanti-tray Sealerplus 程控定量封口机中封口。



第六步：培养96孔定量盘。

在 $37^{\circ}\text{C}\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 的温度下，培养7天（在培养箱内放入一个托盘，内放入一定体积的水，保证培养箱内湿度达80%）。培养时必须将定量盘纸片一面朝下，孔格一面朝上，最大限度的减少液体损失。



第七步：根据下面的结果判读表读取结果。数出显阳性的孔格，对照MPN表得到结果。如果有稀释请在结果后乘以相应的稀释倍数

结果判读

外观	结果
相对阴性对照而言，无论浑浊与否，任何显褐色的迹象	嗜肺军团菌为阳性
相对阴性对照而言，无论是否显褐色，浊度大于阴性对照	嗜肺军团菌为阳性
如颜色与浊度方面，与阴性对照无差异	嗜肺军团菌为阴性

- Legiolert 试剂的培养时间为 7 日。在 7 日培养内出现的阳性结果和 7 日后显示的阴性检测结果均有效。
- 仅发生浑浊度变化表示嗜肺军团菌在生长，但指示剂还没有很强或很快的显露出来。

过程需注意：

- 建议每一批样品做一个阴性对照，见第 5 页。
- Legiolert 试剂仅可用于澄清水样的检测，不可用于富集水或浓缩水。
- Legiolert 操作过程应确保无菌环境，依据当地监管方针，处理所有实验样品与物料。



图：左边为阴性对照结果，右边为阳性加标结果

六、 饮用水样品：嗜肺军团菌检测步骤

该操作适用于出厂水、管网水、二次供水等饮用水样品。但是淋浴水、冷凝水、冷却水样品检测请参见 五、非饮用水样品：嗜肺军团菌检测步骤

操作视频：<http://www.gbmicrotest.com/legiolert.html> “使用方法/问题&解答”

<p>第一步：样品混匀后取 100mL 水样到不含硫代硫酸钠的无菌瓶（货号：WV120SB-200）中，置于室温。</p>	
<p>第二步：用补充剂套装（Legiolert Supplement, 产品货号WLGT-SUP）中提供的水硬度测试条，测定水样的硬度。</p> <ul style="list-style-type: none">● 0-2个显色条呈阳性则为低硬度● 3-4个显色条呈阳性则为高硬度	
<p>第三步：溶解Legiolert补充液（补充剂套装 Supplement, 产品货号WLGT-SUP）见附录，第15页。</p> <p>加入前摇动补充剂瓶：</p> <ul style="list-style-type: none">● 低硬度（0-2格显色）加入0.33mL补充液● 高硬度（3-4格显色）加入1.0mL补充液	
<p>第四步：加入一个 Legiolert 试剂到第三步混合液中，盖上瓶盖，摇匀直至试剂完全溶解。样品或许会保持浑浊状。</p>	
<p>第五步：将上述处理好的样品全部倒入 Legiolert 96孔定量盘中。轻拍或轻弹定量盘，以排出空气，放入Quanti-tray Sealerplus程控定量封口机中封口。</p>	
<p>第六步：培养96孔定量盘。在$39^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 温度下，培养7天（在培养箱内放入一个托盘，内放入一定体积的水，保证培养箱内湿度达80%）。培养时必须将定量盘纸片一面朝下，孔格一面朝上，最大限度的减少液体损失。</p>	
<p>第七步：根据下面的结果判读表读取结果。数出显阳性的孔格，对照MPN表得到结果。如果有稀释请在结果后乘以相应的稀释倍数。</p>	

结果判读

外观	结果
相对阴性对照而言，无论浑浊与否，任何显褐色的迹象	嗜肺军团菌为阳性
相对阴性对照而言，无论是否显褐色，浊度大于阴性对照	嗜肺军团菌为阳性
如颜色与浊度方面，与阴性对照无差异	嗜肺军团菌为阴性

- Legiolert试剂的培养时间为7日。在7日培养内出现的阳性结果和7日后显示的阴性检测结果均有效。
- 仅发生浑浊度变化表示嗜肺军团菌在生长，但指示剂还没有很强或很快的显露出来。

过程需注意：

- 建议每一批水样，做一个阴性对照。
- Legiolert试剂仅可用于澄清水样的检测，不可用于富集水或浓缩水。
- Legiolert操作过程应确保无菌环境，依据当地监管方针，处理所有试验样品与物料。



图：左边为阴性对照结果，右边为阳性加标结果

七、 附录

1. Legiolert 检测嗜肺军团菌 MPN 表 (单位 MPN/100mL)

		# 大孔阳性数						
		0	1	2	3	4	5	6
小 孔 阳 性 数	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
	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	

小孔阳性数	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
	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	1017.6	
79	85.9	101.0	122.5	155.8	214.4	346.3	1061.6	

小孔阳性数	80	87.1	102.4	124.3	158.1	217.8	352.6	1109.7
	81	88.3	103.8	126.0	160.5	221.2	359.1	1162.9
	82	89.5	105.2	127.8	162.8	224.6	365.6	1222.4
	83	90.7	106.7	129.6	165.2	228.1	372.1	1289.8
	84	91.9	108.1	131.4	167.5	231.6	378.8	1367.7
	85	93.1	109.5	133.2	169.9	235.1	385.6	1459.8
	86	94.3	111.0	135.0	172.3	238.6	392.4	1572.5
	87	95.5	112.4	136.8	174.7	242.2	399.4	1717.8
	88	96.7	113.9	138.6	177.1	245.8	406.4	1922.6
	89	97.9	115.3	140.4	179.5	249.4	413.6	2272.6
	90	99.1	116.8	142.2	181.9	253.0	420.8	>2272.6

2. Legiolert 预处理套装 (Pretreatment) 说明书

介绍

Legiolert 预处理套装 (Pretreatment) 是装在无菌取样瓶中的干燥粉末试剂, 使用时溶解于无菌去离子水中。每瓶预处理试剂 (Pretreatment) 可用于检测 50 个非饮用水样品。

产品货号: WLGT-PRE

包装

2 瓶 Legiolert 预处理试剂

储存

粉末状或水解后请储存在 15-30°C, 保质期前使用完。

预处理液溶解后置于 15-30°C, 12 个月内用完, 但必须在试剂保质期内使用

溶解粉剂

- 1) 加入无菌去离子水到 100mL 刻度线
- 2) 混匀直到试剂全部溶解
- 3) 瓶身上记录配置日期
- 4) 15-30°C 常温储存
- 5) 溶解后的预处理液可保存 1 年的时间, 但是如果溶解前预处理粉剂保质期不足 1 年, 则以粉剂时到期时间为准。

3. Legiolert 补充剂套装 (Supplement) 说明书

介绍

Legiolert 补充剂套装 (Supplement) 是装在无菌取样瓶中的干燥粉末试剂, 使用时溶解于无菌去离子水中。根据硬度不同一套补充试剂可用于检测 100-300 个 100mL 饮用水样品。

产品货号: WLGT-SUP

包装

1 瓶 Legiolert 补充试剂瓶

1 盒硬度测试条

储存

补充剂套装 (Supplement) 粉末状时保存温度在 15-30°C

补充剂溶解后置于 15-30°C, 12 个月内用完, 但必须在试剂保质期内使用

配置

- 1) 使用无菌去离子水, 先加入一半体积的无菌去离子水。搅拌或涡旋混合, 溶解部分粉末, 溶液可能呈浑浊状。
- 2) 继续加入去离子水到 100mL 刻度线, 瓶身上记录配置日期。
- 3) 再次涡旋或摇匀至少 60 秒。溶液可能仍呈浑浊状。
- 4) 补充液 (Supplement) 每次使用前必须涡旋或摇匀。
- 5) 15-30°C 常温储存
- 6) 溶解后的补充剂可保存 1 年的时间, 但是如果溶解前补充剂粉剂保质期不足 1 年, 则以粉剂时到期时间为准。

4. 常见问题解答

1) 与传统方法比对结果?

- 在国内有 29 个省、直辖市，212 家实验室参与试用，170 家实验室已经选用该方法。
- Legiolert 酶底物法嗜肺军团菌的检出率 (93/112=83.04%)，明显高于培养法 (82/112=73.21%)，且两种方法检出率差异有统计学意义 ($\chi^2=7.692$, $P=0.003 < 0.05$)。
- 在方法敏感性上 Legiolert 酶底物法 (98.94%) 高于国标方法 (87.23%)。
- 样本 Legiolert 酶底物法检测的阳性孔随机，(取一孔菌液进行 GVPC 琼脂平板分离培养时)，均能分离到嗜肺军团菌，说明方法特异性好。

2) Legiolert 试剂可以检测哪些样品类型?

Legiolert 试剂可以检测饮用水和非饮用水中嗜肺军团菌。

	饮用水	非饮用水
定义	可以被人们饮用的水体，适合人类饮用的水，又称饮用水，指的是其预期用途是饮用的。	不可被人们饮用的水体，不以饮用为目的的水，但仍可用于许多其他目的，这取决于水质。
举例	出厂水 管网水 饮用水 自动饮水机 厨房龙头水 洗眼装置 制冰机 口腔用水	浴室水龙头/水槽 淋浴喷淋水 Spa 用水，温泉浴室水 公共浴室浴缸水 冷却塔 蒸发冷凝器 流体冷却器 冷冻水返回容器 水箱，高位水箱 空调，冷气机冷凝水 机械/工具用水 涡旋浴缸 泳池水 浴室喷淋 装饰喷泉 未处理的水（地表水、泉水、池塘水） 洗车水 雨水收集储罐

3) Legiolert 检测原理

嗜肺军团菌通过诊断酶在特定的培养基中分解底物，释放出褐色指示物或不带有褐色的混浊指示物，指示检测样品中嗜肺军团菌的存在。

4) Legiolert 检出限是多少?

饮用水样品，每 100mL 可检测 ≥ 1 个嗜肺军团菌。非饮用水样品，每 1mL 可检测 ≥ 1 个嗜肺军团菌。

5) 无菌稀释液？

无菌去离子水、磷酸缓冲液、0.1%蛋白胨水。如果是过滤后或灭菌后的自来水，而不是操作手册里所建议的稀释剂（如去离子水、磷酸缓冲液、0.1%蛋白胨水），会出现水样硬度过高的问题，从而导致假阳性。这也是为什么 100mL 饮用水方法中需要加 Legiolert supplement 补充剂套装。对于非饮用水方法，客户同样也需要用无菌去离子水作为稀释剂。因为稀释剂不仅需要无菌的，里面的化学成分也很重要。

6) Legiolert 检测方法是否需要阳性比色盘？

无需阳性比色盘。建议没批水样做一个阴性对照。可以用阴性对照来判读结果。

7) Legiolert 检测军团菌培养温度和时间？

饮用水样品检测，培养温度： $39^{\circ}\text{C}\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 培养 7 天。

非饮用水样品检测，培养温度： $37^{\circ}\text{C}\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 培养 7 天。

结果可在第七天任意时段内读取。

8) Legiolert 检测饮用水中嗜肺军团菌的培养温度可以不是 39°C 么？检测非饮用水样品可以非 37°C 么？

不可以。如果温度改变会造成结果出现假阳性，或者会由于嗜肺军团菌减少出现假阴性。

9) 需要保持什么水平的湿度才能适合军团菌检测？

Legiolert 测试需要一个 70~85%湿度水平，确保定量盘中样品体积损失 $\leq 15\%$ 。适当的湿度通常可以通过在培养箱底部放置一盘水来达到。或者把定量盘放入潮湿环境的容器中再放入培养箱中。注意，7 天内尽量减少开关培养箱次数，以保证环境适合嗜肺军团菌生长。

10) 如何正确读取结果？

研发部门最近发现，如果 Legiolert 检测嗜肺军团菌在 7 天前从培养箱中取出，并冷却（例，如果它们被留在实验室中 1 分钟），那么军团菌可能会出现错误信号（“非目标菌信号”）。保证嗜肺军团菌检测温度对于降低非目标生长是非常重要的。所以我们建议尽量保证 7 天内减少开关培养箱的次数，阅读仅是隔着视窗读取。一旦从培养箱中取出，则作为最终结果读取，再放入培养箱培养会影响结果正确性。

11) 在 7 天之前读的军团菌结果是否有效？

7 天内出现的阳性结果是有效的。培养不足 7 天出现的阳性反应是确定的嗜肺军团菌阳性结果。注意，一旦被从培养箱中取出阅读结果，则作为最终的检测结果，再放入培养结果不准确。准确的定量结果需要在第 7 天读取。

12) 7 天后读取的结果是否有效？

7 天后的阴性结果是有效的。如果无意间培养时间超过了 7 天，如果定量盘内孔格无褐色显示或无浑浊表现，则阴性结果是有效的。但如果孔格显褐色或浑浊的阳性结果是无效的，需要重新检测。

13) 51 孔或 97 孔盘是否可以用于军团菌检测？

不可以。军团菌检测只可用 Legiolert 96 孔定量盘，且培养时必须纸板面向下。因为 96 孔定量盘和 51 或 97 孔定量盘材质不同，不能替换使用。

14) Legiolert 方法可以定性检测么？

不可以。因为取样瓶不透气。嗜肺军团菌是需氧菌。所以不可以定性检测。

15) Legiolert 试剂的储存条件是？

Legiolert 试剂储存在 2-25°C 避光，避免潮湿环境。

16) Legiolert 试剂的物理性状？

Legiolert 试剂是浅驼色可自由流动的粉末。

17) Legiolert 定量仪可以用国产程控定量封口机替代么？

不可以，Legiolert 定量设备只可以与 Sealerplus 升级版程控定量封口机匹配。

18) 如何处理阳性结果定量盘？

可将阳性定量盘先高压灭菌处理后找相关部门处理。

19) Legiolert 试剂在检测前是否需要在室温放置？

IDEXX 并未做温度影响的测试，但所有检测样品需要在检测前室温放置。

20) Legiolert 检测方法的质量控制？

可选用 NSI-QC 军团菌定量质控样品（货号：11192）或选用嗜肺军团菌 ATCC 33152 (WDCM 00107) 或 ATCC 33156 (WDCM 00180) 可作为阳性菌株。粪肠球菌 ATCC 29212 (WDCM 00087) 可作为阴性控制菌株。

21) Legiolert 检测军团菌可以用二氧化碳 (CO₂) 培养箱培养么？

不可以。使用 Legiolert 检测军团菌选用常规的培养箱，温度可达 39±0.5°C 即可。

22) 是否在检测之前知道样品类型（饮用水或非饮用水）？

需要知道。Legiolert 试剂检测饮用水和非饮用水的操作步骤不同。如果选用饮用水样品的操作步骤做非饮用水样品，则会出现假阳性结果，该环境利于非嗜肺军团菌生长。如果选用非饮用水样品的操作步骤做饮用水样品，则会出现假阴性结果，因为预处理步骤及检测样品量小会减少嗜肺军团菌生长。

23) 如何做嗜肺军团菌能力验证（PT 样）或质控样？

1. 100mL 无菌去离子水或 PBS 加入取样瓶（不含硫代硫酸钠）中；
2. 加入阳性菌株或质控样品；
3. 混合液中加入一个 Legiolert 试剂；
4. 盖上瓶盖，摇匀直至试剂完全溶解。样品或许会保持浑浊状。
5. 将上述处理好的样品全部倒入 Legiolert 96 孔定量盘中。轻拍或轻弹定量盘，以排出空气，立即放入军团菌配套设备中，培养。
6. 39°C±0.5°C 的温度下，培养 7 天（在培养箱内放入一个托盘，内放入一定体积的水，保证培养箱内湿度达 80%）。培养时必须将定量盘纸片一面朝下，孔格一面朝上，

最大限度的减少液体损失。

24) 如何使用补充剂套装 (supplyment) 的测试条?

1. 检测 100mL 饮用水时, 将试纸条放入水样中 1 秒。
2. 取出后等待 60 秒, 观察结果。
3. 0-2 个测试块由兰变红则加入 0.33mL 补充剂套装液体。
4. 3-4 个测试块由兰变红则加入 1mL 补充剂套装液体。

25) 可以在 BCYE-CYE 培养基上确认吗?

不可以。传统方法需要确认实验, 但是 Legiolert 方法不需要确认实验。

如果用 Legiolert 方法做菌种分型, 只需要将纸板戳破吸一定量军团菌显色液体在 BCYE 培养基上划线。

由于 Legiolert 定量盘孔中液体是混合菌 (有嗜肺军团菌也有杂菌) 所以在 BCYE-CYE 上是会长菌的。

26) 为什么 Legiolert 检测非饮用水样品需要预处理?

非饮用水样品中细菌 (非目标菌) 含量高。对非饮用水样品进行预处理, 可最大程度的抑制非目标菌在检测中生长。

27) 阴性对照样品显阳性了, 是什么原因?

1. Legiolert 试剂和 96 孔定量盘是否在保质期内。
2. 无菌纯水是否灭菌且放凉试用。
3. 培养的温度是否在 $37\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 或者 $39\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 。
4. 7 天内培养箱内湿度都要保证 $>80\%$ 。

28) 为什么 96 孔盘很多小孔都空了?

- 96 孔定量盘培养时要纸面向下放置。
- 培养箱内一定放入足够量的液体, 保证培养箱湿度 7 天内均为 $>80\%$ 。
- 可以用任何物品盛放液体 (如烧杯、保湿盒、塑料盆等), 见下图。

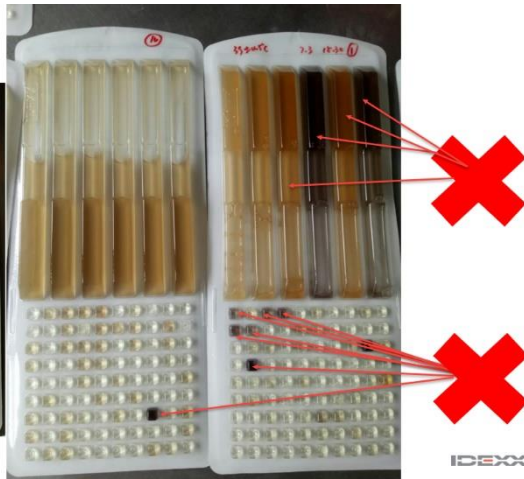


29) 显什么颜色为嗜肺军团菌阳性?

显褐色或浑浊为嗜肺军团菌阳性。显红色或绿色均为非目标菌, 见下图。

非目标菌的颜色

- 非目标菌颜色:
- 显绿色
 - 显偏红色
 - 显很深的颜色



17 Copyright 2016 IDEXX Laboratories

IDEXX

30) 为什么饮用水样品要在 $39\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 培养, 而非饮用水在 $37^{\circ}\text{C}\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 培养?

1. Legiolert 饮用水和非饮用水方案的不同培养温度是确保方法选择性和灵敏度的一部分。饮用水方案的较高培养温度(不包括任何预处理步骤)有助于确保该基质的选择性。
2. 由于非目标菌导致的假阳性结果可在饮用水样品中温度低于 $39^{\circ}\text{C}(\pm 0.5^{\circ}\text{C})$ 时出现。提高温度就提高了军团菌在饮用水样品中的选择性, 并最大限度地减少了非目标细菌的潜在干扰。
3. 非饮用水中也会含有高浓度的非目标菌。使用 Legiolert 预处理液进行了优化, 以防止这些非目标菌干扰检测结果。 $37^{\circ}\text{C}(\pm 0.5^{\circ}\text{C})$ 的较低培养温度将有助于嗜肺军团菌从预处理液应激反应中恢复。

31) 为什么质控样品或能力验证样品要在 $39\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 培养?

QC 样品遵循饮用水方案, 它们也没有添加预处理液步骤, 因此较高的培养温度更适用于培养基的选择性。

32) MPN 与 CFU 如何换算

MPN 等同于 CFU 请参见“国际标准 ISO 6107:2021”。

ISO 6107:2021 包括 CFU 和 MPN 作为可接受的单位来估计可培养微生物的细菌数量。

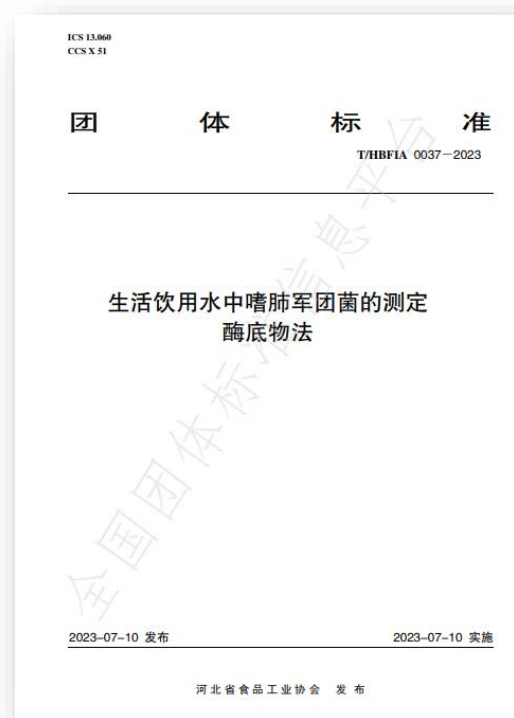
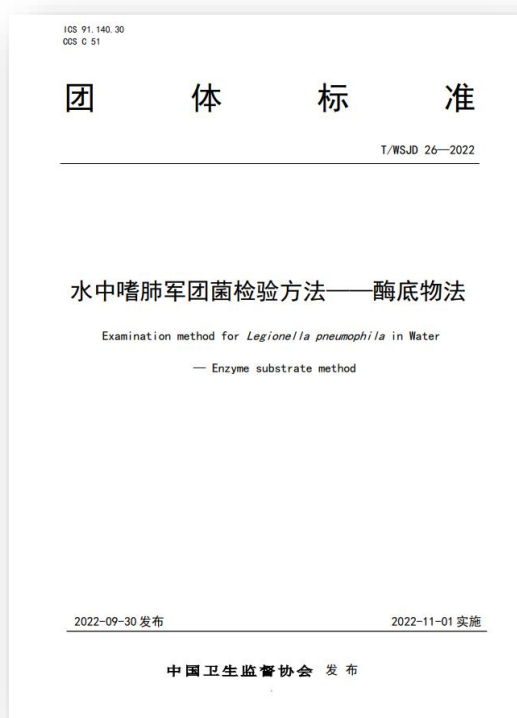
CFU 和 MPN 的定义分别在本标准第 3.120 部分和第 3.350 部分中进行了说明。

在标准第 16 页的第 3 节“术语和定义”, 第 3.146 部分包括可培养微生物的定义。这部分的注释指出, “在给出结果时, 每体积的可培养微生物可以代替每体积 CFU 或每体积 MPN。”

33) Legiolert 利净得 酶底物法检测嗜肺军团菌通过哪些国内外标准认证?

- TWSJD26-2022 《水中嗜肺军团菌检验方法--酶底物法》
- THBFIA 0037—2023 《生活饮用水中嗜肺军团菌的测定 酶底物法》
- 通过美国材料与试验协会 (ASTM) 认证 标准号: D8429-21

- 英国分析师常设委员会(SCA)蓝皮书:水中和其他环境样本中军团菌的测定(2020)-第2部分-检测和枚举的培养方法
- 获得 française de normalisation 法国标准协会 (AFNOR)。(2019年6月19日)。用于水分析的 Legiolert/Quanti Tray* 定量盘方法获得了 AFNOR 的 NF 验证认证, 作为饮用水和非饮用水嗜肺军团菌检测标准 ISO 11731 和 NF T90-431 的替代方法, 证书编号:IDX 33/06-06/19



5. 质量控制过程

注意：质量控制过程 (QC) 和能力验证 (PT) 实验操作见第五“阳性加标实验或 PT 能力验证步骤”

1. 每批次 Legiolert 试剂需使用质控样品 (QC) 进行过程质量控制
 - A. NSI-QC 军团菌定量质控样品 (货号: 11192)
 - B. 美国标准菌库 (ATCC) 或全球微生物数据中心 (WDCM) 标准菌株
 - i. 目标菌: 嗜肺军团菌 ATCC 33152/WDCM 00107 或 ATCC 33156/WDCM 00180; 划线在 BCYE 培养基 35°C 培养 48-72 小时
 - ii. 非目标菌: 粪肠球菌 ATCC 29212/WDCM 00087; 划线在血琼脂平板培养基 35°C 培养 18-24 小时
 - iii. 将每个菌株接种到标记好的 100mL 无菌稀释液, 目标菌浓度为 10^2 - 10^3 cfu; 非目标菌为 10^3 - 10^4 cfu
2. 使用 Quanti-tray 定量盘法进行定量计算
3. 结果应在可接受范围

注意：质量控制样品应使用无菌稀释液 (如脱氯的去离子水、磷酸盐缓冲液、0.1%蛋白胨)。

IDEXX 爱德士公司质量控制过程遵循 ISO 11133:2014.产品质量合格证书可从网站下载

www.gbmicrotest.com

6. 如何做菌种鉴定实验（英）（选做）

SEROTYPING LEGIONELLA PNEUMOPHILA FROM IDEXX QUANTI-TRAY™/ LEGIOLERT®
BY LATEX AGGLUTINATION OR DIRECT FLUORESCENT ANTIBODY MICROSCOPY

1. Scope and Application

1.1. This method is intended for use in serotyping Legionella pneumophila isolates directly from positive wells observed in Quanti-Tray/Legiolert.

1.2. Since not all Legionella pneumophila isolates in Legiolert perform equivalently in serotyping protocols, multiple options are provided.

2. Definitions

2.1. Latex agglutination – a method to detect specific antigens in a sample. Microbeads of latex coated with antigen-specific antibodies bind to antigens in a positive sample and agglutinate, signifying the presence of the antigen.

2.2. Direct fluorescent antibody (DFA) microscopy – a method to detect specific antigens in a sample. Monoclonal antibodies directed against Legionella antigens are conjugated to a fluorochrome, bound to slide-fixed organisms, and imaged using fluorescence microscopy following washing and removal of unbound conjugate.

2.3. Quanti-Tray/Legiolert – a most probable number quantification device used in conjunction with Legiolert growth reagent for the detection of Legionella pneumophila in water samples.

3. Interferences

3.1. No interferences in potable water.

4. Safety

4.1. The analyst/technician must know and observe the normal safety procedures required in a microbiology laboratory preparing, using, and disposing of samples, reagents and materials, and while operating sterilizing equipment.

4.2. Mouth pipetting is prohibited.

5. Equipment and Supplies

5.1. Pipettors capable of delivering 5-1000 µL, sterile pipettor tips, sterile loops.

5.2. Sterile razors or scalpels, disposable alcohol wipes.

5.3. Microfuge tubes with \geq 1.5 mL capacity.

5.4. Microfuge.

6. Reagents

6.1. Latex agglutination reagent kits (Oxoid or comparable); store as per manufacturers guidelines.

6.2. Direct fluorescent antibody kits; store as per manufacturers guidelines.

6.3. Buffered charcoal yeast extract (BCYE) petri plate media; store at 2-10°C.

6.4. Sterile, non-buffered, oxidant-free water.

7. Quality Control

7.1. Quality control of latex agglutination or DFA kits should be conducted as per manufacturers guidelines.

8. Serotyping procedures

8.1. To gain access to a positive Quanti-Tray/Legiolert well, use a scalpel or razor to open the Quanti-Tray from the paper side:

8.1.1. Using a sterile alcohol wipe, clean the paper side of the Quanti-Tray/Legiolert corresponding to the well to be sampled.

8.1.2. Use the same alcohol wipe to sterilize the scalpel or razor.

8.1.3. Cut a slit in the paper side of the tray to open up the well.

8.1.4. Extract the desired volume using a pipettor with disposable tips.

8.1.5. Alternatively, a pipet tip may be used to directly puncture the paper, though the incidence of splattering is greatly increased. Therefore, it is advised that this technique be performed in a biosafety cabinet.

8.2. Procedure Option 1 – Culturing isolates from Quanti-Tray/Legiolert before serotyping.

8.2.1. After opening the target positive well, extract 5 uL of culture and deposit to a BCYE plate.

8.2.2. Streak culture for isolation on BCYE and incubate 2-4 days at 36°C.

8.2.3. Perform serotyping with isolated colonies as per manufacturer's instructions.

8.3. Procedure Option 2 – Serotyping directly out of the Quanti-Tray/Legiolert without additional culturing.

8.3.1. Option 2A – Latex agglutination directly from the well:

8.3.1.1. Add 50 µL of each latex agglutination reagent directly to a unique area of the test surface provided in the kit.

8.3.1.2. Extract 50 µL of material from the opened positive well and add to the latex agglutination reagent.

8.3.1.3. Gently mix up and down in the pipettor 2-4 times, then swirl to observe agglutination as per the manufacturer's instructions.

NOTE: Some isolates detected in Quanti-Tray/Legiolert may have a lower final cell concentration and/or a weak agglutination phenotype. If this is the case, then a user should follow option 2B for concentrating the cells prior to a serotyping test.

8.3.2. Option 2B – Concentrating the cells prior to serotyping:

8.3.2.1. Extract 1.5 mL of culture from the opened positive well and put in a microfuge tube.

NOTE: The goal for this procedure is to produce a 10-fold concentrate, which requires ≥ 1.5 mL of culture. Quanti-Tray/ Legiolert small wells hold ~200 µL of culture and, therefore may be limiting if not pooled, making large wells the primary source of test material. If no large wells are positive, then follow either Option 1 or Option 2a.

8.3.2.2. Spin in a microfuge at ~ 5000 rpm for 1 minute.

8.3.2.3. Remove the cell-free supernatant using a pipettor, taking care not to dislodge the cell pellet.

8.3.2.4. Resuspend the pellet in 150 µL of deionized water.

8.3.2.5. For latex agglutination:

8.3.2.5.1. Add 50 µL of each latex agglutination reagent directly to a unique area of the test

surface provided in the kit.

8.3.2.5.2. Add 50 μL of the concentrate to each agglutination spot and gently mix up and down in the pipettor 2-4 times, then swirl to observe agglutination.

8.3.2.6. For DFA:

8.3.2.6.1. Proceed with manufacturer's instructions using concentrate as the test material.

9. Interpretation and Calculations

9.1. Interpret all serotyping results as per manufacturer's instructions.

10. Waste Management

10.1. It is the laboratory's responsibility to comply with all federal, state and local regulations governing waste management, particularly the biohazard and hazardous identification rules and land disposal regulations. Compliance with all sewage discharge permits and regulations is also required.

10.2. Samples, reference materials and equipment known or suspected to have viable bacteria attached or contained must be sterilized prior to disposal.

7. 如何做菌种鉴定试验（中）（选做）

使用 Legiolert 检测嗜肺军团菌的血清分型 乳胶凝集或直接荧光抗体显微镜

1. 范围和应用

1.1 直接提取 Legiolert 阳性孔格中的军团菌进行血清分型

1.2 因为无法保证所有从 Legiolert 中提取出的嗜肺军团菌都可以，所以提供了多种方案。

2. 定义

2.1 乳胶凝集 -- 一种检测样品中特定抗原的方法。试剂中的抗体与阳性样品中的抗原相结合产生乳胶凝集的现象以检测出抗原的方法。

2.2 直接荧光抗体(DFA)显微镜 -- 一种检测样品中特定抗原的方法。针对军团菌抗原的单克隆抗体被结合到一种荧光色素上，将其固定在玻片上，清洗移除杂质后使用荧光显微镜检测。

2.3 Legiolert 定量盘法 -- 一种最大可能数酶底物法，使用 Legiolert 试剂检测水样中的军团菌。

3. 干扰

3.1 饮用水中无干扰。

4. 安全性

4.1 分析人员/技术人员必须了解并遵守微生物实验室在制备、使用和处理样品、试剂和材料以及操作消毒设备时所需的正常安全程序。

4.2 禁止用嘴吸入。

5. 设备和用品

5.1 5~1000 微升移液枪、无菌移液枪头

5.2 无菌剃刀或解剖刀，一次性的酒精湿巾。

5.3 容量 \geq 1.5mL 的微量离心管

5.4 离心机

6. 试剂

6.1 乳胶凝集试剂盒(Oxoid 或类似品牌);按照制造商的指导方针进行存储。

6.2 直接荧光抗体包;按照制造商的指导方针进行存储。

6.3 缓冲炭酵母提取物(BCYE)培养基;储存在 2 - 10°C。

6.4 无菌，非缓冲液，无氧化剂水

7. 质量控制

7.1 应按照制造商的指导方针进行胶乳凝集或 DFA 试剂盒的质量控制

8. 血清学分型的程序

8.1 从 Legiolert 定量盘中找到阳性孔格，用解剖刀或剃刀来打开定量盘背面：

8.1.1 用酒精擦拭 Legiolert 定量盘背面待取样的阳性孔格处。

8.1.2 用同样的酒精消毒解剖刀或剃刀

8.1.3 在定量盘背后开口，打开阳性孔格

8.1.4 使用移液枪提取所需的样品体积

8.1.5 另一种方法是，可以使用移液管尖端直接穿刺纸张，但溅射的发生率大大增加

8.2 程序选择 1 -血清分型前将从定量盘中提取出的阳性菌进行培养

8.2.1 在打开目标阳性孔格后，吸取 5 uL 的阳性液体接种到 BCYE 平皿上。

8.2.2 在 BCYE 培养皿上进行划线，培养 2 - 4 天 36°C

8.2.3 按照制造商的指示，挑取典型菌落进行血清分型。

8.3 程序选项 2 -直接提取 Legiolert 阳性孔格中的军团菌进行血清分型，无需培养

8.3.1 选择 2A - 直接通过乳胶凝集法对阳性孔格进行血清分型

8.3.1.1. 打开乳胶凝集试剂盒，在每个试剂片孔格中加入 50 μ L 对应试剂

8.3.1.2 从阳性孔格中提取 50 μ L 液体加入到乳胶凝集试剂中

8.3.1.3 使用接种环或者移液枪轻轻地混匀 2-4 次，然后根据制造商的指示，旋转观察凝集反应

8.3.2 选择 2B - 血清分型前先进行样品浓缩和富集

8.3.2.1 从阳性孔中提取 1.5 mL 液体放入一个微型离心管中。

注意：如果从 Legiolert 定量盘的阳性孔格中分离出的菌浓度较低或者和乳胶的凝聚反映较弱，这个时候我们建议使用 2B 的方法在血清分型前进行浓缩。

注意：这个过程的目的在于对其进行 10 倍浓缩,这就要求有 \geq 1.5 毫升的阳性液体。而 Legiolert 定量盘小孔只含 200 微升阳性液体，因此如果只采用单个小孔会产生限制。所以我们在进行 2B 这个步骤时，尽量全部挑取定量盘大孔中的菌。如果没有阳性的大孔，建按照选择 1 或者选择 2A 来进行血清分型。

8.3.2.2 设置离心机转速为 5000rpm 离心 1 分钟

8.3.2.3 使用移液枪去除上清液，注意不要将目标菌去除

8.3.2.4 加入 150 微升去离子水，再悬浮。

8.3.2.5 乳胶凝集：

8.3.2.5.1 打开乳胶凝集试剂盒，在每个试剂片孔格中加入 50 μ L 对应试剂

8.3.2.5.2 添加 50 μ L 浓缩液加入到乳胶凝集试剂中，使用接种环或者移液枪轻轻地混匀 2-4 次，然后观察其凝聚现象以得出结论。

8.3.2.6 DFA:

8.3.2.6.1 按照制造商的指示对浓缩后的液体进行血清分型测试。

9. 结论和计算

9.1 所有血清分型的结论均需按照制造商的指示得出。

10 . 废物处理

10.1 遵守地方有关废物管理的规定，特别是生物危害和危险的识别规则和土地处置条例，是实验室的责任。还要求遵守所有的污水排放许可和规定。

10.2 所有已知含菌或者怀疑含菌的样品、相关耗材试剂和设备在处置前必须灭菌。