

## 前 言

军团病(legionnaires disease)是由军团菌属(*legionella*)、主要是嗜肺军团菌(*legionella pneumophila*)引起的一种细菌性呼吸道传染病。本病在全球普遍存在。我国已有小规模爆发及散发病例。由于军团菌肺炎与其他肺炎不易区别,且老年人容易受到侵犯,一旦患病,病情相当严重。如治疗不当,其病死率可高达15%~20%。为了对军团病患者提供可靠的诊断,进行合适的治疗,结合我国军团病防治工作现状,特制定本标准。

本标准附录A中A2、A3、A4、附录B中B3、B4、B5、B6及附录C的诊断方法为参考诊断方法。

本标准由卫生部疾病控制司提出。

本标准负责起草单位:中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所;参加起草单位:协和医院。

本标准主要起草人:万超群、朱元珏、陆慰萱。

本标准由卫生部委托传染病防治监督管理办公室负责解释。

# 中华人民共和国卫生行业标准

## 军团病诊断标准及处理原则

WS 195—2001

Diagnostic criteria and principles of  
management of legionnaires disease

参照《中华人民共和国传染病防治法》及《中华人民共和国传染病防治法实施办法》制定本标准。

### 1 范围

本标准规定了军团病的诊断标准及处理原则。

本标准适用于各级、各类型医疗保健、卫生防疫机构和人员对军团病病例的诊断和处理。

### 2 诊断原则

2.1 应根据流行病学资料及临床表现和常规实验室检验结果进行综合分析。

2.2 确诊需依据病人双份血清军团菌抗体恢复期较急性期增高 4 倍或以上或军团菌培养阳性。

### 3 诊断标准

#### 3.1 流行病学史

全年均可发病,多数发生在夏秋季节。中老年病例较为多见。有慢性肺病病史者、免疫功能低下者、器官移植者、建筑工地施工人员、近两周内的旅行者以及吸烟者较易感。如发现两例或以上的成组病例,应当进行血清流行病学调查。同时对可疑军团病患者的标本,如痰、血液、胸水、支气管肺泡灌洗液进行军团菌的分离培养,还可从外环境如宾馆、医院、电影院等的空调系统冷却塔水、淋浴水、湖水、井水、池水以及地表面污水中分离军团菌。

#### 3.2 临床表现

临床上可以有两种类型:非肺炎型(pontiac fever)和肺炎型。

##### 3.2.1 非肺炎型

临床表现类似感冒,症状:发热、咳嗽、头痛、肌痛和胸痛,但无肺炎。病程 3~10 天,可自愈。

##### 3.2.2 肺炎型

亚急性起病,症状:发热、头痛、寒颤、咳嗽或痰中带血,胸痛和肌痛,部分病人有恶心、呕吐、腹泻、相对缓脉,有些患者尤其是儿童,可出现精神神经症状如谵妄、幻觉甚至昏迷等,重症病人可发生急性肾功能衰竭、休克,或因菌血症产生的肺外器官感染。X 线胸片显示肺有浸润性阴影,部分有胸腔积液,重症病人有肺脓肿甚至空洞。

#### 3.3 常规实验室检查

多数血沉加快,血白细胞计数增高,部分有中性白细胞核左移,可能有乳酸脱氢酶、血清谷草转氨酶、胆红素升高或有蛋白尿、低钠血症和低磷血症,血尿并不多见,但镜检时尿中可有红细胞。痰或气管内抽吸物作革兰染色和一般培养。军团菌为革兰阴性杆菌,但初代分离菌革兰染色着色不明显,而且培养的阳性率很低。

#### 3.4 特异性实验室检查(参见附录 A、附录 B、附录 C)

##### 3.4.1 军团菌培养

中华人民共和国卫生部 2001-07-20 批准

2002-01-01 实施

以痰、支气管抽吸物、支气管肺泡灌洗液或胸水为标本,在含 N-2-乙酰氨基-2-氨基乙烷磺酸(ACES)的酵母浸膏培养基(BCYE)中培养军团菌。

#### 3.4.2 细菌抗原检测

采用直接荧光抗体法(DFA)。

#### 3.4.3 血清特异性抗体检测

采用间接荧光抗体法(IFA)、试管凝集试验(TA)等方法检测军团菌特异性抗体。起病时及3~8周后两次血清军团菌抗体滴度呈4倍或以上增长,单次抗体大于1:256(IFA),或凝集抗体从1:40呈4倍或以上增长或一次凝集滴度为1:320(TA)者,可确定有军团菌感染。

### 3.5 病例分类

#### 3.5.1 临床诊断

满足3.1、3.2、3.3加3.4.2。

#### 3.5.2 确诊病例

满足3.1、3.2、3.3加3.4.1或3.4.2。

## 4 处理原则(参见附录D)

4.1 早期发现病人,早期治疗:对可疑病人应及时进行特异性实验室检查以明确诊断。确诊者可选用红霉素、阿奇霉素等或和利福平一并使用,复方新诺明、四环素、环丙沙星、强力霉素对部分病人有效。应尽量避免使用糖类皮质激素。

4.2 早期发现并发症如急性肾功能衰竭、休克等应及时积极抢救。

4.3 如发现成组病例,应向防疫部门报告。通过流行病学调查证实后,采取合适的防治措施,对被军团菌污染的水源,如建筑物中的空调系统冷却塔水、冷热水管道系统水进行细菌学检测,必要时进行消毒处理。对可疑者及易感人群选用红霉素、阿奇霉素等治疗。

**附 录 A**  
(标准的附录)  
**军团病病原学诊断方法**

**A1 直接荧光抗体染色检查法**

本法操作简便,能快速发现各种被检病理标本中是否存在军团菌。但当标本中军团菌数量较少或病原菌为荧光抗血清未包括的新种(型)时,结果常为阴性,故阴性结果不能排除军团病。

**A1.1 荧光抗体制备**

**A1.1.1** 用1%甲醛盐水自固体培养基上洗下军团菌菌苔,4℃过夜杀菌,pH7.2操作PBS洗2次,配制成 $4 \times 10^9$ /mL菌细胞的菌液。

**A1.1.2** 免疫前自家兔取血,用作对照血清,采取皮内注射法或静脉注射法免疫家兔。如凝集反应效价达到1:5 120以上可以全放血,并分离血清。

**A1.1.3** 免疫前兔血清与抗军团菌血清用50%、33%饱和度硫酸铵提取 $\gamma$ -球蛋白,调整蛋白浓度为20 mg/mL。按常法用异硫氰酸荧光素(FITC)标记。

**A1.2 标本制备**

**A1.2.1** 肺组织:新鲜组织可制成印片或研磨成10%悬液后涂膜,于空气中干燥后加热固定,再在涂膜上滴加10%中性甲醛固定10 min。吸弃甲醛后用蒸馏水轻轻漂洗,干燥后镜检。如为甲醛固定组织,可用刀片切成组织块,造成新的组织面,用刀片呈直角在组织上刮取细微的组织颗粒糊,于载玻片上涂膜,干燥后加热固定。

**A1.2.2** 其他标本:痰、支气管灌洗液或抽出物、胸水(应注意抗凝)可选取粘性部分(胸水等也可离心取沉淀物)涂膜,干燥后加热固定。10%中性甲醛固定10 min,蒸馏水漂洗,干燥后染色镜检。可疑培养物:用接种环挑取可疑菌落,混悬于1%甲醛等渗盐水中,涂膜,干燥,加热固定。

**A1.3 染色方法**

**A1.3.1** 荧光抗体工作溶液配制:将标准军团菌株用PBS制成悬液后涂片,使每高倍视野菌数500~600条,用不同稀释度的荧光抗体染色。凡出现3+~4+荧光强度的最高稀释度为1个效价单位(3+:菌细胞发明亮的黄绿色荧光;4+:菌细胞发耀眼的黄绿色荧光)。常规工作中用2个效价单位作为工作溶液。

**A1.3.2** 操作:每份标本在同一张载片上作两个涂膜。一个用免疫前兔 $\gamma$ -球蛋白荧光素标记物染色,作阴性对照;另一用荧光抗体染色。置37℃湿盒中温育30 min后用PBS洗去多余的荧光血清(洗时载片加有荧光抗体的一侧向下),并用PBS浸洗2次(每次5 min),蒸馏水冲洗1次,干燥,涂膜滴加pH9.0缓冲甘油,盖玻片封固,荧光显微镜检查。

**A1.4** 结果的解释:痰胸水、气管抽吸物或灌洗液等标本,每张涂膜上只要发现5条以上染色鲜明、形态典型的军团菌,即可报告阳性。其他临床标本,每张涂片发现有 $\geq 25$ 条强烈发荧光的细菌,报告为阳性,1~24条为可疑,0条为阴性。

**A2 军团菌多重聚合酶链反应(MPCR)和产物检测(参考)****A2.1 寡核苷酸引物的合成**

由中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所军团病课题组设计的一对引物,用以扩增嗜肺军团菌,可产生206bp的产物(mip基因片段)。另一对引物为扩增16SrRNA用。不仅可检测嗜肺军团菌种,而且可以检测某些非嗜肺军团菌种。

## A2.2 扩增程序

在容积为 0.5 mL 的 Eppendorf 离心管中加入(100  $\mu$ L):

10 $\times$ PCR 缓冲液	1/10 体积
dNTPs	200 $\mu$ mol/L
Taq 酶	2units
引物(1,2)(mip)	0.2 $\mu$ mol/L
引物(3,4)(16SrRNA)	0.05 $\mu$ mol/L
模板 DNA(可用至 2 $\mu$ g,取决于靶序列含量)	

加灭菌三蒸水至最终体积 100  $\mu$ L,最后加入 40  $\mu$ L 的灭菌石蜡油。试验分别设立阳性对照和阴性对照各一份。

## A2.3 循环参数

	94 C	61 C	72 C	循环次数
首次循环	2 min	45 s	45 s	1
正式循环	45 s	45 s	45 s	30
末次循环	45 s	45 s	2 min	1

取扩增产物 10  $\mu$ L,加入 2  $\mu$ L 6 $\times$ 溴酚蓝电泳指示缓冲液,在含有 0.5  $\mu$ g/mL 的溴化乙锭的琼脂糖凝胶,于 0.5 $\times$ TBE(或 TAE)缓冲液中进行电泳,电压 5 V/cm,电泳 30 min 后,在紫外灯下观察结果。

## A2.4 结果

凝胶中出现两条特异性 DNA 带[分别为 206 个碱基对(206 bp)及 386 个碱基对(386 bp)]或一条特异性 DNA 带(386 bp)则 PCR 为阳性,如重复试验后未出现特异性 DNA 带,则 PCR 结果为阴性。如待检材料(痰、支气管灌洗液、血液等)PCR 阳性,则提示标本中有特异性军团菌 DNA 片段,出现两条特异性 DNA 带为嗜肺军团菌感染,一条特异性 DNA 带为非嗜肺军团菌感染。

## A3 协同凝集试验(参考)

此法原理是利用金黄色葡萄球菌 A 蛋白(SPA)可与某些动物 IgG 的 Fc 段结合的特性,将军团菌的特异性抗体(IgG 组分)结合于含 SPA 的金黄色葡萄球菌上,再用此致敏 SPA 菌液与标本(含军团菌可溶性抗原的检样或可疑军团菌培养物)进行协同凝集试验。此法重复性及稳定性较差,但操作方便,可供参考。

### A3.1 试剂

#### A3.1.1 SPA 菌稳定液

A3.1.1.1 将含 SPA 的金黄色葡萄球菌 Cowan 1 株或 Nol 800 株接种于固体培养基或液体培养基。固体培养基:蛋白胨(或脉胨)10 g,葡萄糖 1 g,氯化钠 3 g,磷酸氢二钠( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ )2 g,琼脂 25 g,牛肉汤 1 000 mL,用氢氧化钠溶液调 pH 至 7.4,121 C 20 min 高压灭菌,倾注平皿。液体培养基:(T<sub>2</sub>培养基):胰蛋白胨(trypticase)5 g,半胱氨酸 100 mg,酵母浸膏 37.5 mL,葡萄糖 5 g,氯化钠 3.75 g,蒸馏水 500 mL,调 pH 至 7.4,115 C 30 min 灭菌。葡萄球菌 Cowan 1 株以接种液体培养基为好,在固体培养基上生长者易发生菌体自凝。

A3.1.1.2 37 C 培养 24 h 后,用 0.01 mol/L pH7.4 PBS 自固体培养基上洗下菌苔,3 000 r/min 离心 20 min(如在液体培养基中培养,则直接离心)。弃取上清,沉淀用 PBS 洗 2 次,再用含 0.5%甲醛的 PBS 配成 10%(V/V)悬液,于室温放置 3 h 或过夜。然后置 80 C 水浴 15 min(时时摇动),取出后迅速冷却,用 PBS 洗 3 次,再用含 10 g/L  $\text{NaN}_3$  的 PBS 配成 10%(V/V)悬液。4 C 保存可用半年。用前离心,弃上清,用 PBS 洗 1 次。

A3.1.2 致敏 SPA 菌液(抗体-葡萄球菌复合物):取上述 10% SPA 菌稳定液 1 mL,加军团菌种或型特异性抗血清 0.1 mL,混匀于室温反应 30 min,时时摇动。反应完毕,用 PBS 洗 2 次,沉淀悬于含

1.0 g/L NaN<sub>3</sub> 的 PBS 10 mL 中,制成 1% 悬液(或 2%)。分装,4 C 保存,可用半年左右。

### A3.2 试验方法与结果判定

试验在载玻片上进行。取致敏 SPA 菌液 1 滴,加标本(如为尿标本可沸水浴 5 min,离心去沉淀。必要时可用分子量 6000 的聚乙二醇浓缩 10~50 倍。如为待鉴定的细菌培养物,可制成 10 亿菌/mL,然后 100 C 水浴 15 min),1 滴(尿)或内径 5 mm 接种环一满环(菌液)。充分摇匀,在 8 W 日光灯上方观察结果。判断标准为:

4+:菌体凝成大块,液体透明。

3+:菌体凝成大颗粒,液体透明。

2+:菌体凝成较大颗粒,液体较透明。

1+:菌体凝成小颗粒,液体混浊。

—:无颗粒形成,液体全混。或 2 min 后才有细小颗粒。

一般以  $\geq 2+$  为阳性。

将菌液 100 C 加热 15 min,可以避免嗜肺军团菌,博杰曼军团菌和米克戴德军团菌等鞭毛上的非特异性类属抗原所引起的交叉协同凝集反应。

### A4 乳胶凝集试验(参考)

将市售聚苯乙烯胶乳(polystyrene latex)颗粒(0.8  $\mu\text{m}$ )用蒸馏水配制成贮存液,使其在 1:100 稀释时于 650 nm 吸光度达 0.355。取 1 份胶乳贮存液加抗军团菌抗体 IgG(100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )和用 0.1 mol/L pH8.0 甘氨酸缓冲液配制的牛血清白蛋白(200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )混合液 1 份,充分摇匀数分钟,37 C 水浴 2 h,再加入 1% 牛血清白蛋白 2 份,37 C 水浴 30 min。于 4 C 18 000 g 离心 10 min。沉淀用 1% 牛血清白蛋白洗 1 次,再悬入 1 份牛血清白蛋白中,加叠氮钠(NaN<sub>3</sub>)至 0.04%,4 C 保存。对照胶乳试剂用来免疫家兔 IgG 同法制备。待检尿标本沸水浴 5 min,以减少非特异凝集,离心除去沉淀,涂于黑玻璃上的圆环内,滴致敏乳胶和尿标本各 1 滴,充分混匀,在防止干燥的情况下于 180 次/min 震荡器上摇动 20 min。肉眼观察,以  $\geq +$  为阳性。用此法检测尿中嗜肺军团菌血清 1 型可溶性抗原。

### A5 细菌分离培养

#### A5.1 军团菌培养基的制备(1 000 mL)

A5.1.1 称 10 g N-二乙酰胺基-二胺基乙烷磺酸(ACES)倒入锥形瓶,加蒸馏水 950 mL;

A5.1.2 15 mL 10 mol/L 氢氧化钾溶液调 pH 至 7.0;

A5.1.3 称 10 g 酵母浸膏加入锥形瓶,混合后分装到两个锥形瓶中,各 500 mL;

A5.1.4 每个锥形瓶再加入 10 g 琼脂粉和 1 g 活性炭,121.3 C 20 min(同时高压一小瓶蒸馏水和两个滤器,两支注射器);

A5.1.5 分别称 0.4 g 焦磷酸铁和 0.6 g L-半胱氨酸盐酸盐,置于两个平皿中;

A5.1.6 待培养基温度降至约 60 C 时,将灭菌蒸馏水溶解的焦磷酸铁和半胱氨酸,通过滤膜(0.22  $\mu\text{m}$ )过滤除菌,等量加到两个锥形瓶中;

A5.1.7 倒入平皿,每个约 20 mL,覆盖整个平皿底部。

#### A5.2 痰液直接培养法

##### A5.2.1 试剂配制

##### A5.2.1.1 酸中和试剂的配制

A: 0.2 mol/L 氯化钾溶液(14.9 g/L)

B: 0.2 mol/L 盐酸(17.2 ml/L)

18 份 A 和 1 份 B 混合 pH2.0

##### A5.2.1.2 碱中和试剂的配制

C: 0.1 mol/L 氢氧化钾溶液(6.46 g/L)

取 C 10.7 mL+89.3 mL 蒸馏水 pH13

### A5.2.2 步骤

A5.2.2.1 取少量病人痰液至试管中,加 1 mL 酸中和剂,混匀,静置 10 min;

A5.2.2.2 加入 1 mL 碱中和剂,混匀,静置 10 min。离心沉淀,吸取少量沉淀物到 BCYE 培养基(平皿)上划线接种。35℃ 烛缸中孵育。观察 7 天,如发现可疑菌苔,进一步进行鉴定。

## 附录 B

(标准的附录)

### 军团病的血清学诊断方法

#### B1 间接荧光抗体染色法

##### B1.1 试验用液

##### B1.1.1 稀释液:稀释菌液、血清及荧光抗体用

0.01 mol/L PBS	pH7.6
氯化钠	8.0 g
磷酸氢二钠	2.9 g
磷酸二氢钾	0.2 g
蒸馏水	1 000 mL

##### B1.2 实验步骤

B1.2.1 抗原片:抗原片用酒精棉球擦拭后,用稀释液将菌液稀释 10 倍,使之成为 10 亿/mL,然后滴入抗原片孔中,待自然干燥后,用丙酮固定 30 min;

B1.2.2 取反应板递倍稀释待检血清,1:8~1:512,分别滴加到抗原片中,留两孔作为对照,置湿盒中,37℃ 孵育 1 h;

B1.2.3 洗涤 3 次,每次 3 min,不断摇动;

B1.2.4 用稀释液按 1:8 稀释荧光抗体,加入每孔,置湿盒中,37℃ 1 h;

B1.2.5 洗涤,同上。

B1.2.6 结果判断:

4+:菌细胞发出耀眼的黄绿色荧光;

3+:菌细胞发出明亮的黄绿色荧光;

+:荧光清晰,但较 3+ 弱;

+:荧光较弱,刚可辨认;

-:菌细胞不发荧光。

#### B2 试管凝集试验

B2.1 将洁净无菌处理的试管整齐摆放于试管架上,每一血清型 5 管,另设阴性对照(抗原对照)

B2.2 在第一管中加入经高压灭菌的生理盐水 0.9 mL,其余各加 0.5 mL,阳性对照管加入 0.5 mL 适当稀释的兔抗军团菌血清;

B2.3 在第一管中加入 0.1 mL 待检血清,倍比稀释。

B2.4 将浓缩的凝集抗原(制备方法同 B1)用经高压灭菌的生理盐水稀释到终浓度为 10 亿/mL,各管分别加入稀释后凝集抗原 0.5 mL,其最终凝集反应滴度为 1:20~1:320,35~37℃ 反应过夜,次日观察结果。

**B2.5 结果判定:**

4+: 上清完全透明, 菌体于管底呈伞状沉淀, 摇荡时沉淀物产生絮片及颗粒(100%凝集)

3+: 上清几乎完全透明, 有同样的沉淀, 当摇荡时产生絮片及颗粒(75%凝集);

2+: 上清稍为透明, 有同样的沉淀, 当摇荡时产生絮片及颗粒(50%凝集);

1+: 液体有勉强的透明度, 底部有不大的扇状沉淀;

—: 液体均匀混浊, 底部无扇状沉淀。

**B2.6 标准:**凝集度为“++”的血清最大稀释度为血清效价。

**B2.7** 单份血清抗体效价 1 次大于等于 1:320 或双份血清抗体效价从 1:40 呈 4 倍或以上增长者可诊断为该血清型军团菌抗体阳性。

**B3 微量凝集试验(参考)****B3.1 实验用液: 稀释液**

0.067 mol/L PBS	pH6.4
磷酸氢二钠( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ )	6.21 g
磷酸二氢钠( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	7.69 g
氯化钠	8.50 g
蒸馏水	1 000 mL

**B3.2 实验方法**

**B3.2.1** V 形孔板每孔加 25  $\mu\text{L}$  稀释液;

**B3.2.2** 第一孔加入 25  $\mu\text{L}$  待检血清, 倍比稀释, 最后一孔留作阴性对照, (抗原对照)

**B3.2.3** S 稀释凝集抗原, 5 倍稀释, 使菌液浓度成为 20 亿/mL, 每孔 25  $\mu\text{L}$ ;

**B3.2.4** 置湿盒中 37 C 1 h, 再置 4 C 冰箱 4 h;

**B3.2.5** 置日光灯下观察结果, 以 1:32 为阳性, 或双份血清有 4 倍增高者有诊断意义。

**B4 ISA 法****B4.1 缓冲液****B4.1.1 包被液: 碳酸盐缓冲液(pH9.6)**

碳酸钠(无水)	1.50 g
碳酸氢钠	2.93 g
蒸馏水	1 000 mL

**B4.1.2 稀释液: 磷酸盐缓冲液(pH7.4)**

氯化钠	8.0 g
磷酸氢二钠( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ )	2.9 g
磷酸二氢钾	0.2 g
蒸馏水	1 000 mL

**B4.1.3** 洗涤液: 上液加入 0.5 mL 吐温-20;

**B4.1.4 底物缓冲液:(pH5.0)**

甲液: $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ (无水)	19.2 g/L
乙液: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	71.6 g/L

甲液 24.3 mL, 乙液 25.7 mL, 蒸馏水 50 mL, 混合即得 pH5.0 磷酸枸橼酸缓冲液 100 mL。

**B4.1.5 邻苯二胺底物配制:**

磷酸枸橼酸缓冲液(pH5.0)	100 mL
邻苯二胺	40 mg



30%过氧化氢溶液 0.15 mL

#### B4.2 操作方法

B4.2.1 包被:用包被液 1:100 倍稀释可溶性抗原(按常规方法制备),酶标板各孔加入稀释过的包被液 100  $\mu$ L,4 C 冰箱过夜;

B4.2.2 洗涤:3 次,每次 3 min;

B4.2.3 封闭:用含 1%小牛血清白蛋白稀释或 1%白明胶稀释液,37 C,30 min;

B4.2.4 洗涤同上,加待检血清 100  $\mu$ L/孔,血清从 1:10 倍比稀释至 1:2 560,最后一孔为阴性对照,每批实验中,每型设一排阳性血清对照和正常兔血清对照。

B4.2.5 洗涤,加酶结合物 100  $\mu$ L/孔,37 C,1 h。

B4.2.6 洗涤,加邻苯二胺底物液 100  $\mu$ L/孔,37 C,15 min,每孔加入 50  $\mu$ L,2 mol/L 硫酸溶液终止反应。

B4.2.7 结果判定: $\lambda=495$  nm 测 OD 值

质控标准:阴性对照  $A \leq 0.2$

阳性血清在  $\geq 1:320$  稀释度  $A \geq 0.3$

正常兔血清在  $< 1:320$  稀释度  $A < 0.3$

待检血清  $A \geq 0.3$  为该份血清军团菌抗体最终滴度,单份血清滴度  $\geq 1:320$  或双份血清抗体滴度有 4 倍增高者,有诊断意义。

#### B5 Dot-ELISA 方法检测军团菌抗体(参考)

##### B5.1 溶液的配制

###### B5.1.1 PBS-吐温(pH7.4)

磷酸二氢钠( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ )	2.9 g
磷酸氢二钾	0.2 g
氯化钠	8.0 g
蒸馏水	1 000 mL
吐温 20	0.5 mL

###### B5.1.2 10 mmol/L TBS

Tris	1.21 g
氯化钠	9.0 g
浓盐酸	0.5 mL
蒸馏水	1 000 mL

B5.1.3 封闭液:用 100 mmol/L TBS 稀释脱脂牛奶,使浓度为 50 g/L。

##### B5.2 步骤

B5.2.1 按需要取适当大小的硝酸纤维素膜,用尺子划上小方格;

B5.2.2 点膜:将标准可溶性抗原,相当于 20 亿/mL(浊度)点于小格内,每格 2  $\mu$ L,自然风干;

B5.2.3 封闭:用封闭液封闭 30 min;

B5.2.4 倒掉封闭液,加待测血清,血清也用封闭液稀释,置摇床上,室温振荡 2 h;

B5.2.5 吸出血清稀释液,用 PBS-吐温洗 3 次,每次 1 min;

B5.2.6 加酶标羊抗人 IgG 结合物反应,室温摇床振荡 2 h,酶也用封闭液稀释;

B5.2.7 洗涤:用 PBS-吐温洗 2 次,100 mmol/L TBS 洗 1 次。

B5.2.8 显色液:

4-氯-1-苯胺	12 mg
冷乙醇(-20 C 保存)	4 mL

100 mmol/L TBS	20 mL
30%过氧化氢溶液	12 $\mu$ L

**B5.3 结果:**显色 20 min,显色时也在室温下振荡 20 min,有颜色且为实心者,滴度达到 1:320 为阳性,每次实验时均设阳性和阴性对照。

## **B6 间接血凝试验(参考)**

### **B6.1 军团菌可溶性抗原制备**

军团菌抗原结构复杂,用溶菌酶和 DNA 酶消化,乙酸锂和 EDTA 提取及 DEAE 纤维素柱与 Sepharose 6B 柱层析等方法,自嗜肺军团菌血清 1 型(Knoxville 1 株)和血清 2 型(Togus 1 株)分离出型特异和型共同性的两种抗原。型特异性抗原是一种脂蛋白-碳水化合物的复合物,电泳时有 4 条区带。如用 pH7.0 PBS 自琼脂培养基上洗下嗜肺军团菌血清 1 型(Philadelphial 株)的菌苔,15 000 g 离心 20 min,上清用滤膜过滤,冻干,与兔抗血清或人恢复期血清作琼脂双相扩散试验,至少可出现 3 条沉淀线。经 Sepharose 6B 柱分离,可形成两个主峰。其中第一峰含 35%的碳水化合物,2.6%蛋白,1.8%磷脂和 1% 2-酮-3-脱氧辛酸盐是间接荧光抗体试验和微量凝集试验的靶抗原,有型特异性,分子量  $>4 \times 10^6$  道尔顿。用免疫酶标记技术证实存在于菌细胞表面。间接血凝试验所用的可溶性抗原,系用 PBS 浸取的粗制抗原。制备方法如下:

**B6.1.1** 用灭菌的 0.01 mol/L pH7.2 PBS 自 BCYE 琼脂培养基上洗下菌苔,于 Arnold 灭菌器内 101°C 处理 1 h(或沸水浴 1 h),离心弃上清;

**B6.1.2** 用灭菌 PBS 洗沉积的菌细胞 2 次;

**B6.1.3** 按每 0.1 mL 沉淀菌细胞加灭菌 PBS 2 mL,制成细菌悬液。于 4°C 置 10 天,经常摇动;

**B6.1.4** 3 500 r/min 离心 20 min,上清即为可溶性抗原。

### **B6.2 致敏绵羊红细胞**

取 20%甲醛、丙酮醛醛化红细胞悬液 0.1 mL(绵羊红细胞双醛化法,见“注”),1 500 r/min 离心 5 min,弃上清,加入用 0.2 mol/L pH4.0 乙酸-乙酸钠缓冲液稀释的军团菌可溶性抗原 1 mL(稀释度通过方阵滴定法预试选定),混匀。37°C 水浴 1 h 致敏。用 PBS 洗 3 次后,以含 1 g/L 明胶、0.4 g/L 牛血清白蛋白、0.5%(V/V)羊细胞膜的 pH 7.2、0.1 mol/L PB(稀释液)配成 0.7%悬液。

### **B6.3 操作与结果解释**

于 V 型 46 孔微量血凝反应板上按常法进行,待检血清用稀释液自 1:2 起作连续双倍稀释至 1:4 096。试管排各孔补加稀释液 1 滴,阻断试验排各孔加最适稀释度抗原 1 滴,然后各孔均加致敏红细胞 1 滴。各孔总量为 0.075 mL,混匀 1 min,置 37°C 湿盒 1~2 h 后观察结果。以 50%(2+)凝集为终点。阻断试验排出现血凝抑制应  $\geq 2$  孔。每批试验应以相应的兔抗军团菌抗血清作阳性对照,其血凝效价变化不应  $> 2$  孔。如双份血清抗体效价明显增高者,可考虑军团菌感染。

注:双醛化绵羊红细胞(SRBC)的制备

1. 将 SRBC 用 10~20 倍容积 0.11 mol/L pH 7.2 PB 洗 5 次,再用此 PB 配成 8%悬液;

2. 缓慢加入等容积丙酮醛、甲醛混合液(丙酮醛 15 mL,甲醛 8 mL,0.11 mol/L pH 7.2 PB 60 mL,用 100 g/L 氢氧化钠溶液调 pH 至 7.2,再补加 PB 至 100 mL),室温缓慢搅拌 17 h,1 500 r/min 离心 20 min,弃上清,沉积细胞用 PB 洗 3 次,并配成 20%悬液,加叠氮钠( $\text{NaN}_3$ )至 1 g/L,4°C 保存备用。

## **附录 C**

(标准的附录)

### **军团病分子生物学诊断方法(参考)**

用地高辛标记的特异性军团菌 DNA 探针进行核酸杂交检查,全过程包括探针标记、靶 DNA 的制

备、膜结合、杂交和显色 5 个步骤。

### C1 地高辛(DIG)标记 DNA 探针

C1.1 特异性 DNA 片段的获得:PCR 或全染色体酶切(取特定分子量片段)。

C1.2 DNA 片段的纯化和回收:低熔点琼脂糖凝胶纯化法或透析袋纯化法,经酚/三氯甲烷抽提,乙醇沉淀。

C1.3 DNA 片段的 DIG 标记:(随机引物法)

将完全变性的 DNA 片段加进微型离心管内(置于冰浴中),分别加入

2 $\mu$ L	六核苷酸混合物
2 $\mu$ L	dNTP 标记混合物

再加入适量灭菌三蒸水调溶液积为 19  $\mu$ L,短暂离心,最后加入 1  $\mu$ L Klenow 酶,混匀,37 C 孵育 1 h 以上,也可过夜。用 EDTA 终止反应。

C1.4 探针的标记效果检测:(Dot blot 反向杂交法)

将已制备好的探针 100 C 沸水浴变性 5 min,立即置于冰水浴中 5 min 以上。取少量(1  $\mu$ L 左右)点于硝酸纤维素膜上,80 C 固定后,直接进入结果检测过程。

### C2 靶 DNA 的制备

C2.1 细菌培养:军团菌 BCYE 培养基,35 C 烛缸培养 48 h;

C2.2 DNA 提取:SDS 裂解,酚/三氯甲烷抽提法。

### C3 DNA 结合于硝酸纤维素膜上

C3.1 Southern blot:电泳结束后,琼脂糖凝胶变性 60 min(变性液:0.6 mol/L 氯化钠溶液 0.2 mol/L 氢氧化钠溶液),蒸馏水漂洗 1 min;中和 60 min(中和液:0.15 mol/L Tris-HCl pH 7.6,1.5 mol/L 氯化钠溶液),弃中和液转膜。

C3.2 Dot blot:将 DNA 样品在沸水浴中变性 10 min,迅速放于冰水中,用微量加样器将样品加到硝酸纤维素膜上,晾干后 80 C 固定 2 h。以三蒸水或已知无特异 DNA 片段的样本作为阴性对照。

### C4 探针与靶 DNA 杂交

D4.1 预杂交:将转移好的硝酸纤维素膜装入大小相仿的塑料袋内,加入预杂交液,封口,68 C 预杂交 1 h 以上,晃动。

C4.2 杂交:去预杂交液,加入杂交液(含 Dig-11-dUTP 标记探针,其余成分同预杂交液),70 C 保温 6 h 以上(杂交条件取决于探针和靶 DNA)。洗去未杂交的探针:2 $\times$ SSC,1.0 g/L SDS 100 mL,5 min $\times$ 2,室温;0.1 $\times$ SSC,1.0 g/L SDS 100 mL,70 C,15 min $\times$ 2。洗膜时置摇床上摇动。

### C5 杂交结果的检测

C5.1 地高辛抗体结合:先将杂交膜在缓冲液 I 中室温洗 1 min,换缓冲液 I (100 mL)室温洗膜 30 min,倾去液体,加入 20 mL 抗体液(含抗体地高辛 150 u/mL,缓冲液 I)浸泡 30 min,室温。

C5.2 显色:用缓冲液 I 100 mL 洗膜,15 min $\times$ 2,去除未结合的抗体;换缓冲液 II 20 mL 平衡膜 2 min。将膜装入塑料袋内,加入 10 mL 显色液,封膜,避光数分钟至 24 h,及时观察,到显色满意时,用 50 mL 缓冲液 IV 洗膜终止反应。

C6 结果判定:当硝酸纤维素膜上出现有蓝色条带(Southern blot,大小与琼脂糖凝胶中 DNA 条带相仿)或蓝色圆点(Dot blot),即为检测结果阳性,同时,阴性对照应无染色。

部分试剂的配制

## 20×SSC:

氯化钠	175.3 g
$\text{Na}_3 \cdot \text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	88.2 g
10 mol/L 氢氧化钠调 pH 值到 7.0, 加蒸馏水至 1 000 mL。	

## 50×Denhart:

聚蔗糖(Ficoll 400)	1 g
聚乙烯吡咯烷酮(PVP)	1 g
牛血清白蛋白(BSA)	1 g
蒸馏水	100 mL
溶解后, 微孔滤膜过滤灭菌, 10 mL 分装, -20℃ 贮存备用。	

## 预杂交液:

50×Denhart	5.0 mL
20×SSC	7.5 ml
100 g/L SDS	0.5 mL
蒸馏水	37.0 mL

## 缓冲液 I:

100 mmol/L Tris-HCl	pH7.5
150 mmol/L 氯化钠	

## 缓冲液 II:

封闭液(10%)	10 mL
缓冲液 I	90 mL

## 缓冲液 III:

100 mmol/L Tris-HCl	pH9.5
100 mmol/L 氯化钠溶液	
50 mmol/L 氯化镁溶液	

## 缓冲液 IV:

10 mmol/L Tris-HCl	pH8.0
1 mmol/L EDTA	

## 显色液:(现配)

45 μL	NBT
35 μL	BCIP
10 mL	缓冲液 III

## 附录 D

(标准的附录)

## 军团病治疗原则

## D1 非肺炎型

## D1.1 对症治疗

## D1.2 病原治疗

口服红霉素 1~2.0 g/日或阿奇霉素、克拉霉素、罗红霉素、环丙沙星、四环素、磺胺甲异噁唑与甲氧苄啶等。

## D2 肺炎型

### D2.1 一般治疗

卧床休息,流质饮食,有失水者可静脉补液,保持尿密度 $<1.020$ ,血钠 $<145\text{ mmol/L}$ ,补充足够热量、蛋白质和维生素。观察呼吸、心率、血压及尿量。注意可能发生的急性肾功能衰竭、休克等。

D2.2 高热、头痛、呕吐、腹泻等分别给予对症处理,有明显胸痛、肌痛可给少量止痛剂。氧分压( $\text{Po}_2$ ) $<8.0\text{ kPa}$ 或紫绀者应给吸氧,腹泻可用止泻剂如黄连素,烦躁不安、谵妄可用安定或水合氯醛,不用抑制呼吸的镇静剂。

### D2.3 病原治疗

可选用以下药物:红霉素 $1\sim2.0\text{ g/日}$ ,甚至 $3.0\text{ g/日}$ 口服或静滴;阿齐霉素 $0.25\sim0.5\text{ g/日}$ 口服或静滴;克拉霉素 $0.25\text{ g}$ 口服2次/日或 $500\text{ mg}$ 静滴每12h1次;环丙沙星或氧氟沙星 $200\sim400\text{ mg}$ 每8h~12h一次口服或静滴;利福平 $0.45\sim0.6\text{ g/日}$ 口服,一般肺炎使用10~28天,对免疫功能低下或胸片显示病变广泛者,疗程至少3周。尽可能联合用药,如大环内酯类抗生素或氟喹诺酮药与利福平一并使用。四环素、罗红霉素、磺胺甲基异噁唑与甲苄胺嘧啶也有效。而青霉素、 $\beta$ -内酰胺类和氨基糖甙类抗生素治疗无效。

### D2.4 并发急性肾功能衰竭时的治疗

D2.4.1 调节水、电解质和酸碱平衡。

D2.4.2 控制氮质潴留。

D2.4.3 供给足够营养。

### D2.5 并发休克时的治疗

D2.5.1 给低分子右旋糖酐或平衡盐液,补充血容量,酸中毒可用碳酸氢钠。

D2.5.2 用多巴胺或异丙基肾上腺素等血管活性物质,使收缩压维持在 $12\sim13.3\text{ kPa}$ 左右。当休克并发肾功能衰竭时可用利尿剂,合并心力衰竭时可酌用强心剂。