水中退伍軍人菌檢測方法

NIEA W238.50C

一、方法概要

水樣經濃縮及酸處理後，塗抹於活性碳酵母萃取物選擇性培養基（Buffered charcoal yeast extract agar with selective supplements, BCYE with selective supplements），在二氧化碳培養箱，36 ± 1℃，培養 5 ± 2 天，疑似退伍軍人菌（*Legionella* spp.）的菌落，應進行半胱氨酸需求試驗（L-cysteine requirement test）、革蘭氏染色（Gram stain）及直接螢光抗體染色試驗（Direct immunofluorescent antibody test，DFA）或乳膠凝集試驗（Latex agglutination test）確認。

凡生長於含半胱氨酸之活性碳酵母萃取物培養基（BCYE），但不生長於不含半胱氨酸之活性碳酵母萃取物培養基（BCYE without L-cysteine）之菌落，革蘭氏染色鏡檢為革蘭氏陰性桿菌，無莢膜、不產孢子、短胖型或長絲型，及直接螢光抗體檢驗或乳膠凝集試驗呈陽性反應者，即判定為退伍軍人菌陽性菌落。

二、適用範圍

(一) 本方法適用飲用水水質、飲用水之水源水質及水塔冷卻水中退伍軍人菌之檢驗。

(二) 生物安全等級二級以上之實驗室才能進行本方法之檢測。

三、干擾

(一) 水樣中含有抑制或促進退伍軍人菌生長之物質（如水樣中含有消毒劑或營養源會抑制或促進生長）。

(二) 檢測使用的器皿及設備含有抑制或促進退伍軍人菌生長的物質（如器皿及設備含有清潔劑或營養源會抑制或促進生長）。

(三) 濁度過高之水樣易造成濾膜孔隙阻塞，將影響水樣的濃縮效率，進而影響檢測結果。

(四) 雜菌過多將遮蔽或抑制退伍軍人菌之生長。

四、設備與材料

(一) 量筒：100 至 1000 mL 之量筒。

(二) 吸管：有 0.1 mL 刻度之 10 mL 滅菌玻璃吸管或市售無菌塑膠吸管，或無菌微量吸管（micropipet）。

(三) 試管：大小約 150 × 15 mm 之試管或有蓋螺旋試管。

(四) 稀釋瓶：容量約 100 mL 可滅菌之硼矽玻璃製品。

(五) 錐形瓶：200 至 2000 mL 之可滅菌硼矽玻璃製品。

(六) 採樣容器：容量 500 mL 以上無菌之硼矽玻璃瓶或無菌塑膠有蓋容器，或市售無菌袋。

(七) 冰箱：溫度能保持在 4 ± 2℃者。

(八) 培養皿：可滅菌硼矽玻璃製或可拋棄式無菌塑膠製培養皿，大小為 90～100 × 15 mm 或其他適當大小。

(九) 過濾裝置：能耐高溫高壓滅菌的玻璃、塑膠、陶瓷或不鏽鋼等材質構成之無縫隙漏斗，以鎖定裝置、磁力或重力固定於底部。

(十) 抽氣幫浦：水壓式或吸氣式，壓力差最好在 138 至 207 kPa 者。

(十一) 濾膜：直徑 47 mm，孔徑 0.22 μm 的無菌聚碳酸濾膜（polycarbonate membrane）。

(十二) 天平：待測物重量大於 2 g 時，須能精秤至 0.01 g；待測物重量不大於 2 g 時，須能精秤至 0.001 g。

(十三) 二氧化碳培養箱（CO_2培養箱）：能提供 2.5～5.0% CO_2，溫度能保持在 36 ± 1℃者。

(十四) 高壓滅菌釜：溫度能維持在 121℃（壓力約 15 lb / in^2或 1.1 Kg / cm^2）滅菌 15 分鐘以上者。

(十五) 高溫乾熱烘箱：如用於玻璃器皿等用具之滅菌，溫度須能保持在 160℃達 2 小時或 170℃達 1 小時以上者。

(十六) 加熱板：可調溫度，並附磁石攪拌功能。

(十七) 鑷子：前端平滑、內側無波紋，使用前浸泡於 95%酒精再以火燄燃燒滅菌。

(十八) 接種環：為白金或鎳鉻合金製，適用於細菌接種或移植，亦可使用無菌塑膠製品。

(十九) 水浴槽：溫度能保持在約 50℃者。

(二十) 第二級生物安全櫃（Class Ⅱ BSC）。

(二十一) pH 計：pH 計之精密度必須達到 0.1 pH 單位。用於內含瓊脂培養基之 pH 值測定時，應搭配表面電極（surface probe）。

(二十二) 解剖顯微鏡：能放大 10～20 倍。

(二十三) 光學顯微鏡：能放大至 1000 倍油鏡。

(二十四) 螢光顯微鏡：能放大至 1000 倍。

(二十五) 紫外光燈：波長 365 nm。

(二十六) 試管震盪器（Vortex mixer）。

(二十七) 馬克法藍氏濁度標準計（McFarland nephelometer standard units）。

(二十八) 玻片及蓋玻片：光學染色及螢光染色專用兩種。

(二十九) 乳膠或 PVC 手套。

(三　十) 離心機：轉速可達 3000 g，30 分鐘以上，能控制溫度在 4 ± 2℃者。

(三十一) 離心管：10～50 mL，具螺紋蓋為佳。

五、試劑

(一) 試劑水：蒸餾水或去離子水，導電度在 25℃時小於 2 μmho / cm（μS / cm）。

(二) 0.2 M HCl：配製方法可任選下列任一種方式（用於配製 HCl-KCl 酸性緩衝液）

１、取 17.4 mL 35.4%濃鹽酸（試藥級）（比重 1.18），加試劑水至 1 L。

２、取 20.0 mL 31.5%濃鹽酸（試藥級）（比重 1.16），加試劑水至 1 L。

(三) 0.2 M KCl：（用於配製 HCl-KCl 酸性緩衝液）

秤取 14.92 g KCl（試藥級），先溶於少量試劑水中，俟完全溶解後，再加試劑水至全量為 1 L。

(四) 1 N HCl：配製方法可任選下列任一種方式（用於調整培養基之 pH 值）

１、取 8.8 mL 35.4%濃鹽酸（試藥級）（比重 1.18），加試劑水至 100 mL。

２、取 10.0 mL 31.5%濃鹽酸（試藥級）（比重 1.16），加試劑水至 100 mL。

(五) 1 N KOH：（用於調整培養基之 pH 值）

秤取 5.6 g KOH（試藥級），先溶於少量試劑水中，俟完全溶解後，再加試劑水至全量為 100 mL。

(六) 1 倍磷酸鹽緩衝液：（用於直接螢光抗體檢驗）

磷酸二氫鉀（KH_2PO_4）（試藥級）	2 g
氯化鉀（KCl）（試藥級）	2 g
氯化鈉（NaCl）（試藥級）	80 g
磷酸氫二鈉（Na_2HPO_4）（試藥級）	11.5 g

配製方法：將以上成分混合，先溶於少量試劑水中，俟完全溶解後，再加試劑水至全量為 1 L。

(七) 1%甲醛（福馬林）：（用於直接螢光抗體檢驗）

取 2.67 mL 37.5%福馬林（試藥級），加 1 倍磷酸鹽緩衝液至 100 mL。

(八) 3%硫代硫酸鈉：取 3 g 無水硫代硫酸鈉（試藥級），先溶於少量試劑水中，俟完全溶解後，再加試劑水至全量為 100 mL。

(九) 培養基

１、活性碳酵母萃取物培養基：由下列 I、II、III 等成份配製而成（用於疑似退伍軍人菌菌落之半胱胺酸需求試驗、菌株純化及次培養）

I 基礎活性碳酵母萃取物培養基（BCYE agar base）（市售商品化培養基）

酵母萃取物（Yeast extract）	10.0 g
活性碳（Activated charcoal）	2.0 g
α-酮戊二酸（Alpha-ketoglutarate）	1.0 g

乙醯胺基-2-氨基乙磺酸（ACES） 10.0 g

（N-2-acetamido-2-aminoethanesulfonic acid）

焦磷酸鐵（Ferric pyrophosphate） 0.25 g

瓊脂（Agar） 15.0 g

II 氫氧化鉀（KOH）（試藥級） 2.4 g

III 半胱氨酸（L-cysteine）（試藥級） 0.4 g

配製方法：秤取 BCYE agar base 38.25 g 溶於 500 mL 的試劑水中，秤取氫氧化鉀 2.4 g 溶於 490 mL 的試劑水中，混合兩者，俟完全溶解後，以 121℃滅菌 15 分鐘，冷卻至約 50℃備用。秤取半胱氨酸 0.4 g 溶於 10 mL 的試劑水中，俟完全溶解後，以 0.22 μm 或 0.45 μm 濾膜過濾除菌。兩者充份混合後，以 1 N HCl 或 1 N KOH 調整 pH 值，先倒出小部份培養基，待凝固後以表面電極測定，培養基最終 pH 值應為 6.9 ± 0.1。倒入約 20 mL 之培養基於無菌培養皿中，室溫下凝固。未用完之培養基可保存於冰箱中，4 ± 2℃下保存期限為 30 天。

2、不含半胱氨酸之活性碳酵母萃取物培養基：由下列 I、II 等成份配製而成（用於疑似退伍軍人菌菌落之半胱胺酸需求試驗）

I 基礎活性碳酵母萃取物培養基（市售商品化培養基）

酵母萃取物 10.0 g

活性碳 2.0 g

α-酮戊二酸 1.0 g

乙醯胺基-2-氨基乙磺酸 10.0 g

焦磷酸鐵 0.25 g

瓊脂 15.0 g

II 氫氧化鉀（試藥級） 2.4 g

配製方法：秤取 BCYE agar base 38.25 g 溶於 500 mL 的試劑水中，秤取氫氧化鉀 2.4 g 溶於 500 mL 的試劑水中，混合兩者，俟完全溶解後，以 121℃滅菌 15 分鐘，冷卻至約 50℃，以 1 N HCl 或 1 N KOH 調整 pH 值，先倒出小部份培養基，待凝固後以表面電極測定，培養基最終 pH 值應為 6.9 ± 0.1。倒入約 20 mL 之培養基於無菌培養皿中，室溫下凝固。未用完之培養基可保存於冰箱中，4 ± 2℃下保存期限為 30 天。本培養基可以血液瓊脂培養基（Blood agar）替代。

3、血液瓊脂培養基（Blood agar）（市售商品化培養基）：即胰蛋白大豆瓊脂培養基（Tryptic soy agar）添加 5%馬或綿羊血（Horse or sheep blood）：（用於疑似退伍軍人菌菌落之半胱胺酸需求試驗）

胰化蛋白胨（Tryptone） 15.0 g

大豆蛋白胨（Soytone）或硫化蛋白胨（Thiopeptone） 5.0 g

氯化鈉（NaCl） 5.0 g

瓊脂（Agar） 15.0 g

蒸餾水（Distilled water） 加至 950 mL

馬或綿羊血（Horse or sheep blood） 50 mL

配製方法：秤取培養基 40g，溶於 950 mL 的試劑水中，經 121℃滅菌 15 分鐘後，冷卻至約 50℃，在無菌環境下加入 50 mL 馬或綿羊血，充分混合後，倒入約 20 mL 之培養基於無菌培養皿中，室溫下凝固。未用完之培養基可保存於冰箱中，4 ± 2℃下保存期限為 30 天。

4、活性碳酵母萃取物選擇性培養基：可選用以下選擇性培養基任一種。

（1）DGVP 選擇性培養基：由下列 I、II、III、IV 等成份配製而成（BCYE with Dye, Glycine, Vancomycin, Polymyxin B）（用於篩選水樣中之退伍軍人菌）

I 基礎活性碳酵母萃取物培養基（市售商品化培養基）

酵母萃取物 10.0 g

活性碳 2.0 g

α-酮戊二酸 1.0 g

乙醯胺基-2-氨基乙磺酸 10.0 g

焦磷酸鐵 0.25 g

瓊脂 15.0 g

II 氫氧化鉀（試藥級） 2.4 g

III 半胱氨酸（試藥級） 0.4 g

IV DGVP 染料及抗生素添加劑（市售商品化抗生素添加劑）

Glycine 3.0 g

Vancomycin 1 mg

Polymycin B 50000 IU

Bromocresol purple 10 mg

Bromothymol blue 10 mg

配製方法：秤取 BCYE agar base 38.25 g 溶於 500 mL 的試劑水中，秤取氫氧化鉀 2.4 g，溶於 480 mL 的試劑水中，混合兩者，俟完全溶解後，以 121℃滅菌 15 分鐘，冷卻至約 50℃備用。秤取半胱氨酸 0.4 g 溶於 10 mL 的試劑水中，俟完全溶解後，以 0.22 μm 或 0.45 μm 濾膜過濾除菌。取 1 管市售之 DGVP 染料及抗生素添加劑溶於 10 mL 的試劑水中，俟完全溶解後，以 0.22 μm 或 0.45 μm 濾膜過濾除菌。三者充份混合後，以 1 N HCl 或 1 N KOH 調整 pH 值，先倒出小部份培養基，待凝固後以表面電極測定，培養基最終 pH 值應為 6.9 ± 0.1。倒入約 20 mL 之培養基於無菌培養皿中，室溫下凝固。未用完之培養基可保存於冰箱中，4 ± 2℃下保存期限為 30 天。

（2）CCVC 選擇性培養基：由下列 I、II、III、IV 等成份配製而成（BCYE with Cephalothin, Colistin, Vancomycin, Cycloheximide）（用於篩選水樣中之退伍軍人菌）

I　基礎活性碳酵母萃取物培養基（市售商品化培養基）

酵母萃取物　10.0 g

活性碳 2.0 g

α-酮戊二酸 1.0 g

乙醯胺基-2-氨基乙磺酸 10.0 g

焦磷酸鐵　0.25 g

瓊脂　15.0 g

II　氫氧化鉀（試藥級）　2.4 g

III　半胱氨酸（試藥級）　0.4 g

IV　CCVC 抗生素添加劑（市售商品化抗生素添加劑）

Cycloheximide　80 mg

Colistin 16 mg

Vancomycin　0.5 mg

Cephalothin　4 mg

配製方法：秤取 BCYE agar base 38.25 g 溶於 500 mL 的試劑水中，秤取氫氧化鉀 2.4 g，溶於 480 mL 的試劑水中，混合兩者，俟完全溶解後，以 121℃滅菌 15 分鐘，冷卻至約 50℃備用。秤取半胱氨酸 0.4 g 溶於 10 mL 的試劑水中，俟完全溶解後，以 0.22 μm 或 0.45μm 濾膜過濾除菌。取 1 管市售之 CCVC 抗生素添加劑溶於 10 mL 的試劑水中，俟完全溶解後，以 0.22 μm 或 0.45 μm 濾膜過濾除菌。三者充份混合後，以 1 N HCl 或 1 N KOH 調整 pH 值，先倒出小部份培養基，待凝固後以表面電極測定，培養基最終 pH 值應為 6.9 ± 0.1。倒入約 20 mL 之培養基於無菌培養皿中，室溫下凝固。未用完之培養基可保存於冰箱中，4 ± 2℃下保存期限為 30 天。

(十) HCl-KCl 酸性緩衝液（Acid buffer）：

以 0.2 M HCl 調整 0.2 M KCl 之 pH 值為 2.2 ± 0.1。經 121℃滅菌 15 分鐘後，儲存於冰箱中備用。4 ± 2℃下保存期限為 30 天。

(十一)　無菌稀釋液：不建議使用含鹽類之緩衝液。

1、水樣以 0.22 μm 或 0.45 μm 濾膜過濾之過濾水。如欲用於水樣 10 倍序列稀釋，分裝之體積須為 90 ± 2.0 mL。4 ± 2℃下保存期限為 3 個月。

2、0.1%蛋白胨（Peptone）溶液：

秤取蛋白胨（試藥級）1 g 溶於 1 L 試劑水水中，俟完全溶解後，以 121℃滅菌 15 分鐘，置於 48 ± 2℃的水浴槽中冷卻，冷卻後分裝適量之蛋白胨溶液於稀釋瓶中，作為無菌稀釋液用。如欲用於水樣 10 倍序列稀釋，分裝的無菌稀釋液滅菌後之體積須為 90 ± 2.0 mL。4 ± 2℃下保存期限為 3 個月。

(十二) 75%酒精：消毒擦拭用。

(十三) 革蘭氏染劑：市售商品化試劑，含有結晶紫染劑（Crystal violet）、革蘭氏碘液媒染劑（Gram iodine）、脫色劑（Decolorizer）及碳酸複紅染劑（Carbolfuchsin）等四劑。

(十四) 退伍軍人菌直接螢光抗體檢驗試劑組【備註 1】：內含有 FITC 螢光標定，對退伍軍人菌有專一性之單一及多價抗體（Monospecific conjugates and Panvalent conjugates）、1 倍之磷酸鹽緩衝液（1 x PBS）、封片膠（Mounting media）。

(十五) 退伍軍人菌乳膠凝集試驗試劑組【備註 2】：內含有吸附抗體的藍色乳膠粒子，包括抗 *Legionella pneumophila* serogroup 1 antigen 抗體乳膠粒子、抗 *Legionella pneumophila* serogroup 2～14 antigen 抗體乳膠粒子、抗 *Legionella* species 及 serotypes 抗體乳膠粒子、陽性對照菌液（Positive control suspension）、陰性對照菌液（Negative control suspension）、1 倍磷酸鹽緩衝溶液、凝集試驗紙卡（agglutination reaction cards）。

六、採樣及保存

(一) 採集適量水樣，一般建議 100～1000 mL。採水樣時應使用清潔並經滅菌之玻璃或塑膠容器或市售無菌採樣袋，且於採樣時應避免受到污染。水樣若含有餘氯時，無菌容器中應加入適量之硫代硫酸鈉（採取含氯之飲用水及冷卻水塔之冷卻水水樣時，每 100 mL 之水樣加入 0.1 mL 之 3%硫代硫酸鈉，可中和之餘氯量約為 5 mg/L）。

(二) 飲用水及飲用水水源採樣方法，請依據環保署公告方法，飲用水水質採樣方法－自來水系統（W101）、監測井地下水採樣方法（W103），及河川、湖泊及水庫水質採樣通則（W104）執行採樣。

(三) 冷卻水塔採樣：運行中之冷卻水塔，採集滴落之水樣。無運轉之冷卻水塔，則將無菌容器及採樣袋沉入水面下約 10 公分逕行採樣，但應避免採集過多的沉積物。

(四) 採樣前應清潔手部，再行採水樣，所採水樣應具有代表性。

(五) 運送時水樣溫度應維持在小於 10℃且不得凍結，而實驗室內保存溫度應維持在 4 ± 2℃。

(六) 水樣應於採樣後 24 小時內完成水樣塗抹步驟（七、步驟(三)），並置入培養箱中培養。

(七) 若採樣時有吸入含退伍軍人菌水霧之虞者，宜佩戴適當呼吸防護具。

七、步驟

(一) 水中退伍軍人菌含量高，直接以活性碳酵母萃取物選擇性培養基進行檢測，水中退伍軍人菌含量低則應先行濃縮，因為水樣濃度未知，一般建議水樣先進行濃縮，濃縮方式可以濾膜法或離心法實施，水樣濁度高應以離心法進行水樣濃縮。

１、 濾膜法：過濾前水樣必須劇烈搖晃 25 次以上，以使樣品充分混合均勻。以無菌鑷子夾起無菌濾膜，放在無菌過濾裝置之有孔平板上，小心將漏斗固定，將過濾裝置接上抽氣幫浦。加入適量無菌蒸餾水，以測定過濾設備是否裝置妥當。取適量水樣進行過濾，過濾後再以 20～30 mL 之無菌稀釋液【五、(十一)１、或２、】沖洗漏斗，沖洗過濾後，解開真空裝置，將漏斗移開，儘速以無菌鑷子取出過濾後之濾膜置於離心管內（亦可將濾膜以無菌剪刀剪成碎片後置入離心管），加入適量無菌稀釋液使成 10 倍濃縮水樣，並確認液體能全部覆蓋濾膜，以試管震盪器劇烈震盪 3～5 分鐘，懸浮液即為 10 倍過濾濃縮後之樣品。

２、 離心法：取適量水樣加入離心管內，以 6000 g 離心 10 分鐘以上，或以 3000 g 離心 30 分鐘以上，上清液應以吸管吸取丟棄，不可將離心管以倒置之方式去除上清液，上清液取完後加入適量無菌稀釋液使成 10 倍濃縮水樣，以試管震盪器劇烈震盪，使離心沉澱物（pellet）均勻分布於溶液中，懸浮液即為離心法 10 倍濃縮後之樣品。

(二) 水樣經濃縮後，非退伍軍人菌之微生物也一併被濃縮，微生物彼此競爭及抑制的情況下，雜菌將會影響退伍軍人菌之生長，所以應先將濃縮水樣進行酸處理去除雜菌，再以活性碳酵母萃取物選擇性培養基進行檢測。酸處理之做法：取 1 份上述（七、(一)１、濾膜法）或（七、(一)２、離心法）之 10 倍濃縮水樣，加 1 份 HCl-KCl 酸性緩衝液，在室溫下作用 3～5 分鐘，酸處理後之樣品應立即塗抹於活性碳酵母萃取物選擇性培養基中。

(三) 取 0.1 mL 原液（上述七、(二)之 10 倍濃縮酸處理水樣），或 10 倍序列稀釋各稀釋度之水樣，滴在 BCYE 選擇性培養基中，將無菌之彎曲玻璃棒放在培養基上，再用手或旋轉桌（turn table）旋轉培養皿至水樣均勻分佈於培養基表面。水樣皆需進行二重複。

(四) 倒置培養皿於二氧化碳培養箱中，在 2.5～5.0% CO_2，36 ± 1℃下，培養 5 ± 2 天（培養期間應於培養箱底部放置水盤，以提供培養環境必要之溼度）。

(五) 培養完成後應以解剖顯微鏡進行菌落觀察，典型菌落圓形邊緣平滑、白色或白灰色半透明具毛玻璃外觀，但有些菌株呈藍白、藍灰、藍綠、藍紅、淡綠、淡紅或棕色菌落。在波長 365 nm 的紫外燈下觀察，有些菌株產生藍綠色自發螢光，有些菌株產生藍白色、紅色自發螢光，具有上述特徵之菌落均屬退伍軍人菌疑似菌落（*Legionella*-like organisms），應進行半胱胺酸需求試驗。

(六) 半胱胺酸需求試驗：首先用無菌接種環挑取疑似菌落，以三區（或四區）劃線之方式接種於 BCYE 培養基，進行純化，倒置培養皿於二氧化碳培養箱中，在 2.5～5.0% CO_2，36 ± 1℃下，培養 48 ± 3 小時，觀察菌落之顏色及外觀判定是單一菌株後，取一個菌落劃線於不含半胱胺酸之 BCYE 培養基（可以血液瓊脂培養基代替不含半胱胺酸之 BCYE 培養基），培養條件同純化培養，結果陽性退伍軍人菌株應於 BCYE 培養基生長，且不含半胱胺酸之 BCYE 培養基（或血液瓊脂培養基）不生長。陽性菌株需再進行改良式革蘭氏染色及直接螢光抗體染色檢驗確認。

(七) 改良式革蘭氏染色

１、抹片製作：挑取 BCYE 培養基上之疑似菌落，於載玻片上製成薄抹片，風乾並過火數次固定。

２、 初染：將已固定之抹片，用結晶紫染劑染 1 分鐘，水洗 5 秒鐘。

３、 媒染：加革蘭氏碘液媒染劑（Gram iodine）染 1 分鐘，水洗 5 秒鐘。

４、 脫色：用脫色劑洗至不再有紫色褪出，數秒即可，水洗 5 秒鐘。

５、 複染：用碳酸複紅染劑染 30 秒鐘，水洗 5 秒鐘。

６、 自然風乾。

７、 以光學顯微鏡鏡檢，觀察是否為革蘭氏陰性桿菌，無莢膜、不產孢子、短胖型或長絲型。

(八) 直接螢光抗體檢驗法

１、 抹片製作：以無菌棉花棒或無菌接種環挑取若干單一菌落，溶於 1%福馬林中，製成濃度為 McFarland No.1 的懸浮液（約 3×10^8 CFU/mL），將菌液滴入螢光染色專用玻片之圓圈內，吸去多餘菌液，自然風乾並過火固定。

２、 螢光抗體染色

先以多價抗體及陰性對照組抗體進行篩選，若多價抗體篩選為陽性反應，且陰性對照組抗體篩選為陰性反應時，再以合適之單一抗體進行確認。

（1）製備對照組抗原：將對照組抗原劇烈搖晃混勻後，滴入螢光染色專用玻片之圓圈內，吸去多餘菌液，自然風乾並過火固定。可與菌株抹片同時製作。

（2）將多價抗體共軛物或單一抗體共軛物滴至每個樣品及相對應之對照組抗原。每個樣品皆須進行一個陰性對照組。

（3）室溫作用 20 分鐘。

（4）用磷酸鹽緩衝液輕輕沖洗以除去未鍵結之抗體或將玻片浸入磷酸鹽緩衝液泡 15 分鐘。

（5）用蒸餾水沖洗，自然風乾。

（6）加一滴封片膠，蓋上蓋玻片，圓圈中應避免有氣泡產生，以免妨礙鏡檢。

（7）以螢光顯微鏡鏡檢，先用低倍物鏡（10X）觀察，見到標的菌株後再轉至高倍（40X），可再以 100X 油鏡確認結果。

3、結果判定：由鏡檢中可見到退伍軍人菌為單一桿狀，同時出現非常亮的螢光（3＋～4＋），則認定為陽性結果。2＋以下之螢光強度，則判定為陰性反應。

退伍軍人菌細胞壁螢光強度定義

4＋	菌體被染上非常耀眼之黃綠色
3＋	亮黃綠色
2＋	可觀察到但是有點模糊之染色
1＋	可觀察到但是很微弱之染色
－	沒有任何菌體出現黃綠色但是可能出現黃褐色之背景值

(九) 乳膠凝集試驗

1、取出相關乳膠試劑回溫。將乳膠懸浮液劇烈振盪充份混合均勻。

2、在凝集試驗紙卡之四個圓圈內一角各滴一滴乳膠試劑（latex reagent）（四瓶分滴四個圓圈中）。

3、在四個圓圈中另一角各加入一滴磷酸鹽緩衝液，注意不要碰到乳膠試劑。

4、使用接種環挑出可疑菌落（至少 1 mm，若菌落太小則 2 個或多個）各與磷酸鹽緩衝液混合均勻。若待檢測之分離株為絲狀且粘稠則以接種環挑選 4－10 個相似菌株置入含 0.4 mL 0.85%生理食鹽水試管（或微量離心管）中，以振盪器劇烈混合 5 秒鐘後取 1 滴使用（不必再加磷酸鹽緩衝液）。

5、用接種環或牙籤將圓圈內兩種液體混合均勻，塗布於整個圓圈內。

6、將試驗紙以圓形旋轉方式輕輕搖勻一分鐘。

7、觀察凝集結果以判定血清型別。若藍色乳膠粒子在一分鐘內凝集且對照組（control latex）的圓圈內無凝集反應即判為陽性，陽性結果表示所偵測的菌落含有該種血清型抗原。若藍色乳膠粒子在一分鐘以上仍沒有凝集反應且維持均勻藍色懸浮液，即判為陰性。

8、嗜肺性退伍軍人菌第 1 型試驗(*Legionella pneumophila* serogroup 1 test)、嗜肺性退伍軍人菌第 2～14 型試驗(*Legionella pneumophila* serogroup 2 - 14 test）及退伍軍人菌屬其他菌種試驗（*Legionella* species test）均為陰性之菌落，應進一步以直接螢光抗體試驗（七步驟(八)），進行退伍軍人菌屬（非嗜肺性退伍軍人菌）其他菌種之檢測，均為陰性才能判定為非退伍軍人菌菌落。

9、實驗完畢之凝集試驗紙卡應以高溫高壓滅菌處理。

八、結果處理

(一) 退伍軍人菌陽性判定標準：將七、(五)退伍軍人菌疑似菌落，經半胱胺酸需求試驗、革蘭氏染色及直接免疫螢光抗體檢驗或乳膠凝集試驗，均符合退伍軍人菌陽性反應之結果，即判定為退伍軍人菌。

(二) 每一培養皿之退伍軍人菌疑似菌落，依據菌落形態、顏色及自發螢光加以歸類，每一類至少挑選 3 個菌落（不足 3 個菌落者全選），進行八、(一)陽性判定，依挑選菌落數之陽性比例，回推計算該類陽性菌落數【備註 3】。

$$\text{某一類退伍軍人菌陽性菌落數} = \text{疑似菌落數} \times \frac{\text{陽性菌落數}}{\text{挑選出進行陽性測試菌落數}}$$

(三) 加總每一類之陽性確認菌落數，即為該培養皿之退伍軍人菌總數。

(四) 以含 30 至 300 個菌落之同一稀釋度的兩個培養皿計算其菌落數，二重覆的兩個培養皿菌落數相加計算其平均值，單位以菌落數（CFU）/ mL)表示，計算公式如下：

$$\text{退伍軍人菌濃度（CFU / mL）} = \frac{\text{培養皿陽性菌落數之總合}}{\text{取出塗抹之水樣體積總合}} \div 10 \times 2$$

$$= \frac{X+Y}{0.1/D+0.1/D} \div 10 \times 2$$

X、Y 代表 D 稀釋度的兩個培養皿之菌落數

D 代表 10 倍濃縮水樣的稀釋度

(五) 培養皿之菌落數不在 30 至 300 個菌落之間時，則依菌落數實際數目以下列方式處理：

1、若原液及各稀釋水樣中僅有一個稀釋度的一個培養皿菌落數在 30 至 300 個之間，則以上述公式計算之。

2、若原液培養皿中均無菌落生長，則菌落數以小於 1（＜1）表示；若僅原液有菌落產生且少於 30 個，亦應計數菌落數。

3、若各培養皿之菌落數均不在 30 至 300 個之間，則選取最接近 300 個菌落數之同一稀釋度的兩個培養皿以上述公式計算。

(六) 數據表示：未檢出表示計算所得之菌落數小於 1，以「＜1」表示；菌落數小於 100 時，以整數表示（小數位數四捨五入），菌落數大於 100 以上時，只取兩位有效數字，例如菌落數為 142 時以 1.4×10^2 表示之，菌落數 155 時以 1.6×10^2 表示之，菌落數為 18900 時以 1.9×10^4 表示。

(七) 檢測紀錄須註明採樣時間、培養起始及終了時間、培養基名稱、培養溫度及各稀釋度的原始數據等相關資料。

九、品質管制

(一) 微生物採樣人員及檢測人員應具備微生物基本訓練及知識。

(二) 每批次採樣時，應進行運送空白。

(三) 每批次或每十個水樣需進行試劑空白實驗。

(四) 用於結果計算之二重複數據，其對數差異值不可超出精密度管制參考範圍（計算方式參考「環境微生物檢測通則—細菌（NIEA E101）」），除非二重複之菌落數均小於 20。

(五) 為確保培養基的品質，應使用市售商品化之培養基進行配備，不可依據藥品成分自行調配。每批次新製備的培養基（活性碳酵母萃取物培養基及活性碳酵母萃取物選擇性培養基），應以陽性菌株【如 *Legionella pneumophila*（BCRC 17854）】進行測試，確認培養出來的微生物菌落大小及數量，與先前使用的培養基一致（同一樣品使用前後兩批培養基分別進行測試，結果之對數差異值應落於精密度管制參考範圍內）。另活性碳酵母萃取物選擇性培養基每季應再以陰性控制菌株【如 *Staphylococcus epidermidis*（BCRC 10785）】測試，以確保添加之抗生素仍有藥效（沒有失效）。

(六) 本方法培養所得之細菌可能具有感染性，檢測後之培養基及器皿應經高溫高壓滅菌處理。

十、精密度及準確度

略

十一、參考資料

(一) 衛生署疾病管制局。傳染病標準檢驗方法手冊，2006。

(二) Allegheny County Health Department, Pittsburgh , Pennsylvania. Approaches to prevention and control Legionella infection.1997.

(三) APHA. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 21st Edition, Section 9260 J. Legionella. American Public Health Association, Washington, D.C., 2005.

(四) AS/NZS 3896. Waters－Examination for legionellae including Legionella pneumophila. Australian/New Zealand Standard TM. 1998.

(五) ISO 11731. Water quality－Detection and enumeration of Legionella. International Organization for Standardization, Switzerland. 1998.

(六) Mietzner, S. M. and Stout, J. E. Laboratory Detection of Legionella in Environmental Samples. Clinical Microbiology Newsletter Vol. 24, No. 11. p81～85. Special Pathogens Laboratory, Pittsburgh Veterans Affairs Hearth Care System, Pittsburgh, Pennsylvania. 2002.

(七) TA, A. C., STOUT, J. E., YU, V. L., and WAGENER, M. M. Comparison of Culture Methods for Monitoring Legionella Species in Hospital Potable Water Systems and Recommendations or Standardization of Such Methods. Journal of Clinical Microbiology Vol. 33, p 2118－2123. Veterans Affairs Medical Center and University of Pittsburgh, Pittsburgh, Pennsylvania. 1995.

(八) USEPA. Legionella: human health criteria document. EPA～822～R～99～001. 1999.

(九) Su, H. P., Tung, S. K., Tseng, L. R., Tsai, W. C., Chung,T. C.,Tsung, C. C. Identification of Legionella species by use of an oligonucleotide array. Journal of Clinical Microbiology. Vol. 47, No. 5, p. 1386－1392., 2009.

十二、附錄

退伍軍人菌檢測流程圖

【備註 1】退伍軍人菌直接螢光抗體檢驗法至少應能檢測出以下菌種（species）33 種血清型水體中常見且曾經造成人體致病之菌株

編號	種類	血清型	編號	種類	血清型
1	*Legionella pneumophila*	1～14	9	*Legionella jordanis*	1
2	*Legionella bozemanii*	1～2	10	*Legionella oakridgensis*	1
3	*Legionella longbeachae*	1～2	11	*Legionella wadsworthii*	1
4	*Legionella feeleii*	1～2	12	*Legionella sainthelensi*	1
5	*Legionella hackeliae*	1～2	13	*Legionella anisa*	1
6	*Legionella dumoffii*	1	14	*Legionella santicrucis*	1
7	*Legionella gormanii*	1	15	*Legionella maceachernii*	1
8	*Legionella micdadei*	1	16	*Legionella parisiensis*	1

備註 2】退伍軍人菌乳膠凝集試驗法至少應能檢測出以下 8 菌種（species）25 種血清型之菌株

編號	種類	血清型	編號	種類	血清型
1	*Legionella pneumophila*	1～14	9	*Legionella jordanis*	1
2	*Legionella bozemanii*	1～2	10	*Legionella micdadei*	1
3	*Legionella longbeachae*	1～2	11	*Legionella anisa*	1
4	*Legionella dumoffii*	1	12	*Legionella gormanii*	1
8	*Legionella micdadei*	1	16	*Legionella parisiensis*	1

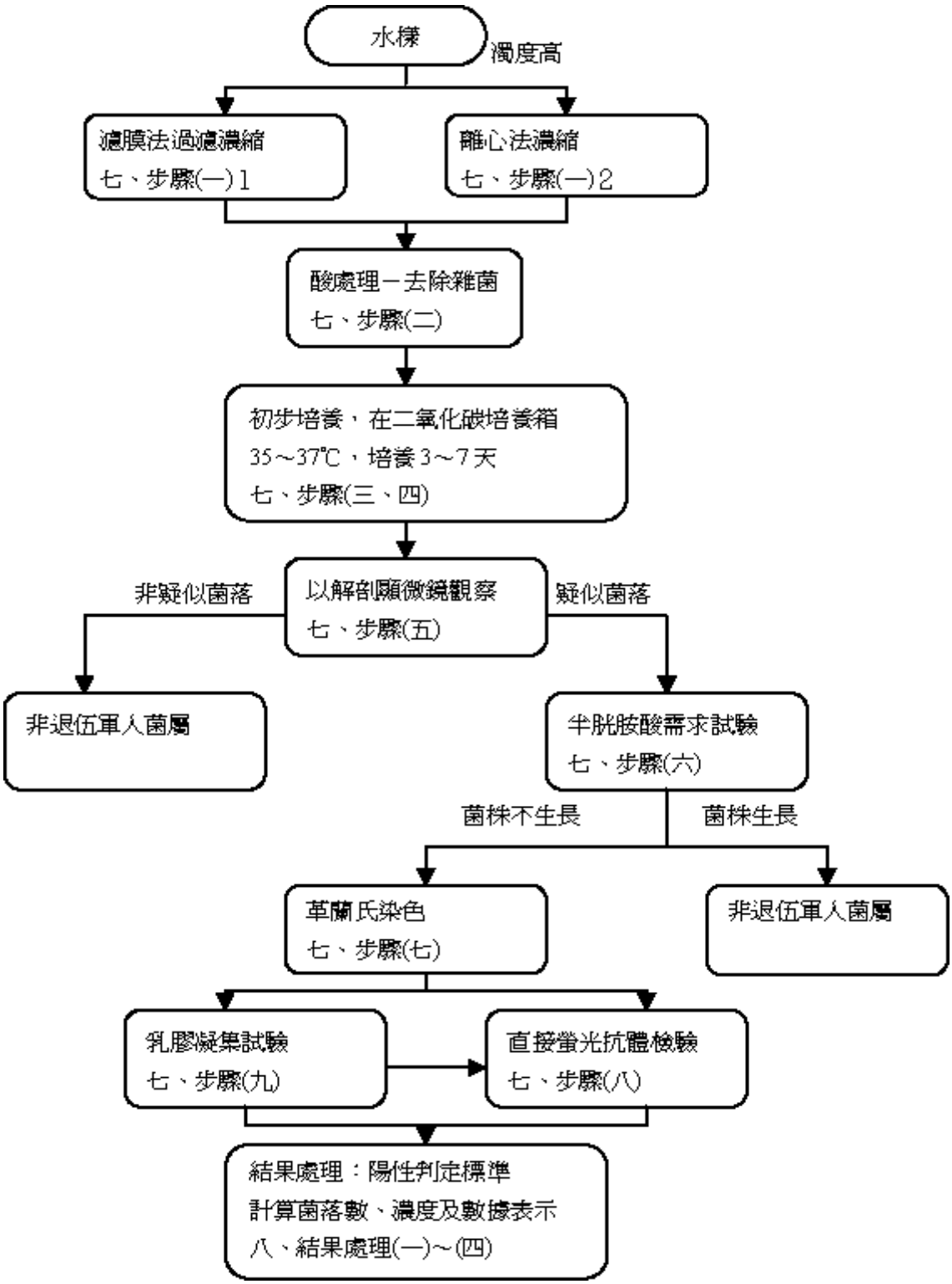
註： 檢測結果若為陰性，應進一步以直接螢光抗體試驗（七、步驟(八)），進行退伍軍人菌屬（非嗜肺性退伍軍人菌）其他菌種之檢測

【備註 3】本方法八、(二)退伍軍人菌陽性菌落數計數範例說明

區分	退伍軍人菌疑似菌落數	隨機挑選進行八、(一)陽性判定菌落數	依據八、(一)判定陽性與陰性菌落數		退伍軍人菌陽性確認菌落數
			陽性	陰性	
第 1 類	120	3	3	0	120 × 3/3 ＝120

第 2 類	90	3	2	1	90 × 2/3 ＝60
第 3 類	88	3	1	2	88 × 1/3 ≒29
第 4 類	2	2	1	1	2 × 1/2 ＝1
合計	300	－			210

退伍軍人菌陽性菌落總數＝120＋60＋29＋1＝210 菌落數

附錄

退伍軍人菌檢測流程圖