|  |  |
| --- | --- |
| ICS  | 13.060 |
| CCS  | C 51 |

中华人民共和国国家标准

GB/T 18204.3—XXXX

代替 GB 18204.3—2013



公共场所卫生检验方法 第3部分：空气微生物

Examination methods for public places - Part 3:Airborne microorganism

征求意见稿

XXXX - XX - XX发布

XXXX - XX - XX实施

`

目次

[前言 II](#_Toc94104184)

[引言 III](#_Toc94104185)

[1 范围 4](#_Toc94104186)

[2 规范性引用文件 4](#_Toc94104187)

[3 术语和定义 4](#_Toc94104188)

[4 细菌总数 5](#_Toc94104189)

[5 真菌总数 7](#_Toc94104190)

[6 β-溶血性链球菌 9](#_Toc94104191)

[7 嗜肺军团菌 12](#_Toc94104192)

[附录A（规范性） 现场采样检测布点要求 21](#_Toc94104193)

1. 前言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件是GB/T 18204《公共场所卫生检验方法》的第3部分。GB/T 18204已经发布了以下部分：

——第1部分：物理因素；

——第2部分：化学污染物；

——第3部分：空气微生物；

——第4部分：公共场所用品用具；

——第5部分：集中空调通风系统；

——第6部分：卫生监测技术规范。

本文件代替GB/T 18204.3—2013 《公共场所卫生检验方法 第3部分 空气微生物》，与GB/T 18204.3—2013相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

1. 增加了“引言”；
2. 增加了“范围”（见第1章）；
3. 增加了“规范性引用文件”（见第2章）；
4. 增加了“术语和定义”（见第3章）；
5. 增加了“细菌总数”的样品的保存和运输、质量控制（见4.1.4.4和4.1.7）；
6. 增加了“真菌总数”的样品的保存和运输、质量控制（见5.1.4.4和5.1.7）；
7. 增加了“β-溶血性链球菌”的样品的保存和运输、生化鉴定、质量控制（见6.1.4、6.1.5.4、6.1.5.5、6.1.7）；
8. 增加了“嗜肺军团菌”的样品的保存和运输、生化鉴定、质量控制（见7.1.4、7.1.5.6、7.1.5.7、7.1.7）；
9. 增加了“嗜肺军团菌”的荧光PCR检测法（见7.2）。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由中华人民共和国国家卫生健康委员会提出并归口。

本文件起草单位：中国疾病预防控制中心环境与健康相关产品安全所、江苏省疾病预防控制中心、深圳市疾病预防控制中心、常州市卫生监督所。

本文件主要起草人：。

本文件及其所代替文件的历次版本发布情况为：

1. 1998年首次发布为GB/T 18204.1—2000，GB/T 17220—1998，2013年第一次修订；
2. 本次为第二次修订。
3. 引言

GB/T 18204《公共场所卫生检验方法》作为公共场所检验技术的推荐性国家标准，与GB 37488《公共场所卫生指标及限值要求》配套，是《公共场所卫生指标及限值要求》的重要技术支撑，为贯彻实施《公共场所卫生指标及限值要求》、开展公共场所空气卫生安全性评价提供检验方法。本文件是GB/T 18204《公共场所卫生检验方法》系列文件的第3部分，目的在于为公共场所空气微生物指标提供相应的检验方法。本次修订对GB 37488《公共场所卫生指标及限值要求》中涉及空气微生物指标的检验方法进行了完善，补充了各项指标采样后的运输和保存要求、质量控制要求，增加了β-溶血性链球菌的生化鉴定步骤，从而有针对性的解决当前标准中部分指标存在操作步骤不清、缺乏质量控制等问题，提高检验方法的准确性和适用性。

GB/T18204《公共场所卫生检验方法》由6个部分构成。

——第1部分：物理因素；

——第2部分：化学污染物；

——第3部分：空气微生物 ；

——第4部分：公共场所用品用具 ；

——第5部分：集中空调通风系统 ；

——第6部分：卫生监测技术规范。

公共场所卫生检验方法

第3部分：空气微生物

* 1. 范围

本文件规定了公共场所空气中细菌总数、真菌总数、*β*-溶血性链球菌和嗜肺军团菌的现场采样与实验室培养方法。

本文件适用于公共场所空气中细菌总数、真菌总数、*β*-溶血性链球菌和嗜肺军团菌的测定，其它场所可参照执行。本文件中同一个指标如果有两个或两个以上检验方法，应根据不同的适用范围选择对应的检验方法，若适用范围相同，可根据技术条件和实际情况选择使用，以第一法为仲裁法。

* 1. 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB 4789.28 食品安全国家标准 食品微生物学检验 培养基和试剂的质量要求

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB 19489 实验室生物安全通用要求

* 1. 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

细菌总数 total bacteria count

公共场所空气中采集的样品，计数在营养琼脂培养基上经36 ℃±1 ℃培养48 h所生长发育的菌落。

真菌总数 total fungl count

公共场所空气中采集的样品，计数在沙氏培养基上经28 ℃、5 d培养所形成的菌落数。

β-溶血性链球菌 β-hemolytic *Streptococcus*

能够产生β型溶血的化脓（或A群）链球菌（*Streptococcus pyogenes*）和无乳（或B群）链球菌(*Streptococcus agalactiae*)。

嗜肺军团菌 *Legionella pneumophila*

是一种兼性细胞内致病菌，在阿米巴体内寄生，可感染人巨噬细胞，在其胞内繁殖和杀死人巨噬细胞，是引起军团菌病的主要病原体。目前已知有3个亚种，16个血清型，血清型1型是引起社区获得性肺炎和医院感染性肺炎的重要病原体。

撞击法 impacting method

采用撞击式空气微生物采样器，使空气通过惯性撞击，从而将悬浮在空气中的微生物采集到采样介质上的采样方法。

自然沉降法 natural sinking method

将培养基平板暴露在空气中，微生物依靠重力作用自然沉降到平板上的采样方法。

* 1. 细菌总数
		1. 撞击法
			1. 原理

采用撞击式空气微生物采样器，使空气通过狭缝或小孔产生高速气流，将悬浮在空气中的微生物采集到营养琼脂平板上，经36 ℃±1 ℃、48 h培养后得到细菌菌落数的测定方法。

* + - 1. 营养琼脂培养基

成分

按如下成分配制：

1. 蛋白胨 10.0 g
2. 肉膏 5.0 g
3. 氯化钠 5.0 g
4. 琼脂 20.0 g
5. 纯水 1 000 mL

制法

将蛋白胨、肉膏、氯化钠溶于纯水中，校正pH为7.2～7.6，加入琼脂，121 ℃，20 min高压灭菌。待冷却到45 ℃时，制成平板备用。

* + - 1. 仪器设备

六级筛孔撞击式微生物采样器。

高压蒸汽灭菌器。

培养箱：36 ℃±1 ℃。

无菌平皿（直径为9 cm）。

制备培养基用一般设备：量筒，锥形瓶，pH计或精密pH试纸等冰箱。

* + - 1. 样品采集和保存

|  |
| --- |
| 采样点：符合附录A的要求。采样环境条件：在相对封闭的公共场所（如宾馆、旅店、招待所等）采样时，应关闭门窗、空气净化设备及新风系统，若采样前空调处于使用状态，则采样时应仍保持空调正常运转。在相对敞开的公共场所（如商场、候车室等）采样时，应保持当时的环境状态。记录室内空调等设备运行状况、门窗状况、人员数量、温湿度及天气状况等。采样方法：以无菌操作，将营养琼脂平板逐级装入六级筛孔撞击式微生物采样器，以28.3 L/min流量采集5 min～15 min。采样器使用按照说明书要求进行。样品的保存和运输：将采集后的营养琼脂平板储存于4 ℃，并尽快返回实验室进行培养。 |

* + - 1. 试验步骤

将采集后的营养琼脂平板倒置于36 ℃±1 ℃培养48 h，菌落计数。

* + - 1. 试验数据处理
				1. 结果计算

公共场所空气中细菌总数浓度按式（1）计算。计算得出的细菌总数的值应四舍五入到整数。

$C=\frac{ΣN×1000}{v×t}$................................................(1)

式中：

*c ——*细菌总数浓度，单位为菌落形成单位每立方米（CFU/m3）；

*ΣN ——*六级平板菌落合计数，单位为菌落形成单位（CFU）；

*v ——*采样流量，单位为升每分钟（L/min）；

*t ——*采样时间，单位为分钟（min）。

* + - * 1. 结果报告

一个区域空气中细菌总数的测定结果按该区域全部采样点中细菌总数测定值的最大值报告，检验结果以每立方米菌落数（CFU/m3）表示。若所有培养平板上均无菌生长，则可报告该区域空气中细菌总数未检出。

* + - 1. 质量控制

在采样开始前，确保所用试剂和材料为无菌状态，操作过程中避免人为污染。

* + 1. 自然沉降法
			1. 原理

将营养琼脂平板暴露在空气中，微生物根据重力作用自然沉降到平板上，经36 ℃±1 ℃、48 h培养后得到细菌菌落数的测定方法。

* + - 1. 培养基与试剂

应符合4.1.2的要求。

* + - 1. 仪器设备

高压蒸汽灭菌器。

培养箱：36 ℃±1 ℃。

无菌平皿（直径为9 cm）。

制备培养基用一般设备：量筒，锥形瓶，pH计或精密pH试纸等冰箱。

* + - 1. 样品采集和保存

|  |
| --- |
| 采样点：符合附录A的要求。采样环境条件：符合4.1.4.2的要求。采样方法：以无菌操作，将营养琼脂平板置于采样点处，打开皿盖，暴露5min后盖上皿盖。样品的保存和运输：将采集后的营养琼脂平板储存于4 ℃，并尽快返回实验室进行培养。 |

* + - 1. 试验步骤

将采集后的营养琼脂平板倒置于36 ℃±1 ℃培养48 h，菌落计数。

* + - 1. 试验数据处理
				1. 结果计算

计数每块平板上生长的菌落数。

* + - * 1. 结果报告

一个区域空气中细菌总数的测定结果按该区域全部采样点中细菌总数测定值的平均值报告，检验结果以每平皿菌落数（CFU/皿）表示，计算得出的细菌总数的值应四舍五入到整数。若所有培养平板上均无菌生长，则可报告该区域空气中细菌总数未检出。

* + - 1. 质量控制

在采样开始前，确保所用试剂和材料为无菌状态，操作过程中避免人为污染。

* 1. 真菌总数
		1. 撞击法
			1. 原理

采用撞击式空气微生物采样器，使空气通过狭缝或小孔产生高速气流，从而将悬浮在空气中的微生物采集到沙氏琼脂培养基平板上，经实验室培养后得到真菌总数。

* + - 1. 沙氏琼脂培养基
				1. 成分

按如下成分配制或采用符合GB 4789.28要求的成品培养基：

1. 蛋白胨 10.0 g
2. 葡萄糖 40.0 g
3. 琼脂 20.0 g
4. 纯水 1 000 mL
	* + - 1. 制法

将蛋白胨和葡萄糖溶解于纯水（纯水水质符合GB/T 6682要求），调整pH为5.5～6.0，分装于玻璃容器中，经115 ℃高压蒸汽灭菌15 min。使用前，用过滤除菌方法加入0.1 g/L的氯霉素或 0.3 g/L的链霉素，待冷却到45 ℃左右时，制成沙氏琼脂平板备用。

* + - 1. 仪器设备

六级筛孔撞击式微生物采样器

高压蒸汽灭菌器。

恒温培养箱：28 ℃±1 ℃。

pH计或精密pH试纸。

平皿（直径为9 cm）、无菌吸管、烧杯等培养基配制一般设备。

* + - 1. 样品采集和保存

采样布点：符合附录A的要求。

采样环境条件：符合4.1.4.2的要求。

采样方法：以无菌操作，将沙氏琼脂平板逐级装入六级筛孔撞击式微生物采样器，以28.3 L/min 流量采集5 min～15 min，采样器使用按照说明书要求进行。

样品的保存和运输：将采集后的沙氏琼脂平板储存于4 ℃，并尽快返回实验室进行培养。

* + - 1. 实验室分析

将采集真菌后的沙氏琼脂平板倒置于28 ℃±1 ℃的恒温培养箱中培养，第3天开始观察真菌生长情况，若真菌数量过多，可于第3天计数结果并记录培养时间，否则于第5天记录结果。

* + - 1. 试验数据处理
				1. 结果计算

公共场所内空气中真菌总数浓度按式（2）计算。

 $C=\frac{ΣN×1000}{v×t}$ (2)

式中：

*c* ——真菌总数浓度，单位为菌落形成单位每立方米（CFU/m3）；

*ΣN* ——六级平板菌落合计数，单位为菌落形成单位（CFU）；

*v* ——采样流量，单位为升每分钟（L/min）；

*t* ——采样时间，单位为分钟（min）。

* + - * 1. 结果报告

一个区域空气中真菌总数的测定结果按该区域全部采样点中真菌总数测定值的最大值报告。在所有平板均无菌生长时报告该区域真菌总数未检出；在有菌生长时，按照公式计算结果，小数点后的数字四舍五入到整数。

* + - 1. 质量控制

每批沙氏琼脂平板配置后需做无菌检查，可每批选定3块平板培养观察，结果应无菌落生长。

采样器需定期在负载条件下用检定合格的流量计进行校准，相对偏差不得超过 5％；在采样前应对采样系统的气密性进行检查，不得漏气；采样前需用酒精棉擦拭采样头，待酒精挥发后采样。

在采样开始前，确保所用试剂和材料为无菌状态，操作过程中避免人为污染。

为避免运输和保存过程中的污染，需同时进行现场空白对照试验，每次或每个区域取一个对照平板，与采样平板同法操作但不需暴露采样，然后与采样后的平板一起放入培养箱培养，结果应无菌落生长。如空白对照有菌生长，则本批次样品作废，需重新采样检测。

* + 1. 自然沉降法
			1. 原理

将沙氏琼脂平板暴露在空气中，微生物依靠重力作用自然沉降到平板上，经实验室培养后得到真菌总数。

* + - 1. 沙氏琼脂培养基

应符合5.1.2的要求。

* + - 1. 仪器设备

高压蒸汽灭菌器。

采样支架。

恒温培养箱：28 ℃±1 ℃。

pH计或精密pH试纸。

平皿（直径为9 cm）、无菌吸管、烧杯等培养基配制一般设备。

* + - 1. 样品采集和保存

采样点：符合附录A的要求。

采样环境条件：应符合4.1.4.2的要求。

采样方法：以无菌操作，将沙氏琼脂平板按采样点布置逐个放置，然后从里到外逐个打开培养皿盖，使培养基表面暴露在空气中，暴露5 min后，从外到里逐个盖上平皿盖。

样品运输和保存：应符合5.1.4.4的要求。

* + - 1. 实验室分析

应符合5.1.5的要求。

* + - 1. 试验数据处理
				1. 结果计算

计数每块平板上生长的真菌菌落数，求出全部采样点的平均真菌菌落数。

* + - * 1. 结果报告

一个区域空气中真菌总数的测定结果按该区域全部采样点中真菌总数测定值的平均值报告，检验结果以每平皿菌落数（CFU/皿）表示，计算得出的真菌菌总数的值应四舍五入到整数。在所有平板均无菌生长时报告该区域真菌总数未检出。

* + - 1. 质量控制

每批沙氏琼脂平板配置后需做无菌检查，可每批选定3块平板培养观察，结果应无菌落生长。

在采样开始前，确保所用试剂和材料为无菌状态，操作过程中避免人为污染。

为避免运输和保存过程中的污染，需同时进行阴性对照试验，每次或每个区域取一个对照平板，与采样平板同法操作但不需暴露采样，然后与采样后的平板一起放入培养箱培养，结果应无菌落生长。如空白对照有菌生长，则本批次样品作废，需重新采样检测。

* 1. β-溶血性链球菌
		1. 撞击法
			1. 原理

 采用撞击法采样、血平板培养基培养计数和生化鉴定的方法测定公共场所空气中的β-溶血性链球菌。

* + - 1. 培养基和试剂
				1. 血琼脂平板

成分

* + - * 1. 蛋白胨 10.0 g
1. 氯化钠 5.0 g
2. 琼脂 20.0 g
3. 脱纤维羊血 5.0 mL～10.0 mL
4. 纯水 1000 mL

制法

脱纤维羊血：在无菌操作条件下，将羊血加入到盛有灭菌玻璃珠的容器中，振摇10 min左右，静置后除去附有血纤维的玻璃珠即可。

将蛋白胨、氯化钠、琼脂加热溶化于蒸馏水中，校正pH为7.5 ± 0.1，121 ℃ 15 min灭菌。待冷却至50 ℃左右，以无菌操作加入无菌脱纤维羊血，摇匀倾皿。

* + - * 1. 革兰氏染色液

结晶紫染色液基础培养基

成分

1. 结晶紫 1.0 g
2. 95 %乙醇 20 mL
3. 1 %草酸铵水溶液 80 mL

制法

将结晶紫完全溶解于乙醇中，然后与草酸铵溶液混合。

* + - * 1. 革兰氏碘液

成分

1. 碘 1.0 g
2. 碘化钾 2.0 g
3. 纯水 300 mL

制法

将碘与碘化钾先进行混合，加入蒸馏水少许充分振摇，待完全溶解后，再加纯水至300 mL。

* + - * 1. 沙黄复染液

成分

1. 沙黄 0.25 g
2. 95 %乙醇 10 mL
3. 纯水 90 mL

制法

将沙黄溶解于乙醇中，然后用纯水稀释。

* + - * 1. 染色操作步骤

将涂片在酒精灯火焰上固定，滴加结晶紫染色液，染1 min，水洗，滴加革兰氏碘液，作用1 min，水洗，滴加95 %乙醇脱色，约15 s～30 s，直至染色液被洗掉，不要过分脱色，水洗，滴加复染液，复染1 min，水洗后进行干燥，镜检。

* + - * 1. 3 %过氧化氢（H2O2）溶液

成分

1. 30 %过氧化氢溶液 100 mL
2. 纯水 900 mL

制法

吸取100 mL过氧化氢溶液，溶于纯水中，混匀，分装备用。

* + - 1. 仪器和设备

六级筛孔撞击式微生物采样器。

高压蒸汽灭菌器。

CO2培养箱。

普通显微镜：10倍～100倍。

电子天平。

* + - 1. 样品采集和保存

应符合4.1.4的要求。

* + - 1. 实验室分析

培养方法：采样后的血琼脂平板在36 ℃±1 ℃，5 % CO2培养24 h～48 h。

菌落形态：培养后，在血琼脂平板上形成灰白色、表面突起、直径0.5 nm～0.7 nm的细小菌落，菌落透明或半透明，表面光滑有乳光；菌落周围有明显的2 nm～4 nm界限分明、完全透明无色溶血环。

革兰氏染色镜检：挑取可疑菌落染色镜检。β-溶血性链球菌为革兰氏阳性无芽孢球菌，圆形或卵圆形，呈链状排列。

触酶试验：挑取可疑菌落于洁净的载玻片上，滴加适量的3 %过氧化氢溶液，立即产生气泡者为阳性，β-溶血性链球菌为阴性。

其他检验：使用生化鉴定试剂盒或生化鉴定卡对可疑菌落进行鉴定。

* + - 1. 试验数据处理
				1. 结果计算

采样点β-溶血性链球菌结果计算：菌落计数，记录结果并按稀释比与采气体积换算成CFU/m3 (每立方米空气中菌落形成单位)。

* + - * 1. 结果报告

一个区域空气中β-溶血性链球菌的测定结果按该区域全部采样点中β-溶血性链球菌测定值中的最大值给出。在所有平板均无菌生长时报告该区域β-溶血性链球菌未检出。

* + - 1. 质量控制

每批血琼脂平板配置后需做无菌检查，可每批选定3块平板培养观察，结果应无菌落生长。

在采样开始前，确保所用试剂和材料为无菌状态，操作过程中避免人为污染。

为避免运输和保存过程中的污染，需同时进行空白对照试验，每次或每个区域取一个对照平板，与采样平板同法操作但不需暴露采样，然后与采样后的平板一起放入培养箱培养，结果应无菌落生长。如空白对照有菌生长，则本批次样品作废，需重新采样检测

触酶试验应设置阳性对照（β-溶血性链球菌ATCC 21059）和阴性对照（金黄色葡萄球菌ATCC 25923）。

* 1. 嗜肺军团菌
		1. 撞击法
			1. 原理

采用液体冲击法采样、培养法定性测定公共场所空气中的嗜肺军团菌。

* + - 1. 培养基和试剂
				1. 采样吸收液1-GVPC液体培养基

GVPC添加剂成分

1. 多黏菌素B硫酸盐 10 mg
2. 万古霉素 0.5 mg
3. 放线菌酮 80 mg

BCYE添加剂成分

1. α-酮戊二酸 1.0 g
2. N-2酰胺基－2胺基乙烷磺酸（ACES) 10.0 g
3. 氢氧化钾 2.88 g
4. L-半胱氨酸盐酸盐 0.4 g
5. 焦磷酸铁 0.25 g

吸收液成分

1. 活性炭 2 g
2. 酵母浸出粉 10 g
3. GVPC添加剂
4. BCYE添加剂
5. 纯水 1000 mL

制法

将活性炭、酵母浸出粉加水至1 000 mL．121 ℃下高压灭菌15 min，加入GVPC添加剂（7.1.2.1.1）和BCYE添加剂（7.1.2.1.2），分装于灭菌后的离心管中备用。

* + - * 1. 采样吸收液2--酵母提取液

成分

1. 酵母浸出粉 12 g
2. 纯水 1 000 mL

制法

将酵母浸出粉加水至1 000 mL，121 ℃下高压灭菌15 min，分装于灭菌后的离心管中备用。结晶紫染色液基础培养基

* + - * 1. 盐酸氯化钾溶液【c（HC1·KC1）＝0.01 mol/L】

成分：

1. 盐酸（0.2 mol/L） 3.9 mL
2. 氯化钾（0.2 mol/L） 25 mL

制法

将上述成分混合，用1 mol/L氢氧化钾调整pH为2.2±0.2，121 ℃下高压灭菌15 min备用。

* + - * 1. GVPC琼脂平板
1. 此培养基是在BCYE的基础上再加入三种抗生素及甘氨酸。

选择性添加剂

警告：放线菌酮具有肝毒性，在对粉末状化学制品进行操作时应戴手套和防尘口罩。

1. 甘氨酸（Ammonium-free glycine） 3 g/L
2. 多粘菌素 B（Polymyxin B sulfate） 80000 IU/L
3. 万古霉素盐酸盐（Vancomycin hydrochloride） 0.001 g/L
4. 放线菌酮（Cycloheximide） 0.08 g/L
5. 纳他霉素（Natamycin）可代替放线菌酮。

抗生素添加剂的制备

1. 取适量的多粘菌素B（一般为200 mg）溶解于100 mL水中，使其浓度为14545 IU/mL。混匀后进行膜过滤除菌。用无菌管进行分装，每管5.5 mL，于-25 ℃～-15 ℃保存。使用时，放至室温后再用。
2. 取20 mg万古霉素盐酸盐溶解于20 mL水中，混匀后，进行膜过滤除菌。用无菌管进行分装．每管1 mL，于-25 ℃～-15 ℃保存。使用时，放至室温后再用。
3. 取2 g放线菌酮溶解于100 mL水中，混匀后，进行膜过滤除菌。用无菌管进行分装，每管4 mL．于-25 ℃～-15℃保存。使用时，放至室温后再用。
4. 以上抗生素添加剂冷冻保存最长时间为6个月。

GVPC培养基的制备

按照BCYE培养基的制备方法（7.1.2.5.2）进行配制，在加入a-酮戊二酸单钾盐后，再加入3 g甘氨酸后调节pH值为6.8 ± 0.2。

在加入溶解后的L-半胱氨酸和焦磷酸铁后，再加入三种抗生素添加剂（7.1.2.4.2），混匀。

* + - * 1. BCYE 琼脂平板

成分

1. 酵母提取液（Yeast extract） 10.0 g,
2. 琼脂 12.0 g,
3. 活性炭 2.0 g,
4. α-酮戊二酸单钾盐 1.0 g,
5. ACES缓冲液（N-2-乙酰胺基-2-乙胺磺酸） 10.0 g,
6. 氢氧化钾（KOH） 2.8 g,
7. L-半胱氨酸盐酸盐 0.4 g,
8. 焦磷酸铁［Fe4（P2O7）3］ 0.25 g,
9. 纯水 1 000mL

制法

1. 分别用10 ml水溶解0.4 g L-半胱氨酸盐酸盐和0.25 g焦磷酸铁，再用孔径为0.2 μm的滤膜过滤除菌，储存于无菌容器中，制备半胱氨酸和焦磷酸铁溶液：于-20 ℃保存不超过3个月。
2. 将ACES颗粒加入到500 mL水中，于45 ℃-50 ℃水浴溶解。另取480 mL水加入氢氧化钾，轻摇溶解，将两种溶液混匀，制备ACES缓冲液。
3. 将溶解好的980 ml ACES缓冲液中，加入活性炭、酵母提取液和α-酮戊二酸单钾盐。用0.1 mol/L KOH溶液或0.1 mol/L H2SO4溶液调节pH值至6.8±0.2。加入琼脂，混合均匀后于121 ℃± 1℃高压蒸气灭菌15 mim。灭菌后用冷水浴冷却至50 ℃左右，加人溶解好的L-半胱氨酸盐酸盐溶液和焦磷酸铁溶液，混匀。
4. 每皿倾注20 mL培养基于直径为90 mm-100 mm的平皿中制备平板，直径为60 mm的平皿用于过滤膜的培养。在室温为25 ℃时，培养基最终pH值为6.8±0.2。
5. 让平皿上的多余水分干燥，在2 ℃～8 ℃下于密容器中避光销存1个月。
	* + - 1. BCYE-CYE琼脂平板

除不加L-半胱氨酸盐酸盐外，制备方法同BCYE琼脂平板（7.1.2.5）。

* + - * 1. 革兰氏染色液

应符合6.1.2.2的要求。

* + - * 1. 氧化酶试剂

成分

1. 四甲基对苯二胺盐酸盐 1.0 g
2. 纯水 100 mL

制法

使用前迅速将上述成分溶于水中。

* + - * 1. 硝酸盐培养基

成分

1. 硝酸钾 0.2 g
2. 蛋白水 5 g
3. 纯水 1 000 mL

制法

溶解，调节pH值至7.4 ± 0.2，分装试管，每管约5 mL，于121 ℃ ± 1 ℃高压蒸汽灭菌15 min。

* + - * 1. 硝酸盐还原试剂

甲液：将对氨基苯磺酸0.8 g溶解于2.5 mol/L乙酸溶液100 mL中。

乙液：将甲萘胺0.5 g溶解于2.5 mol/L乙酸溶液100 mL中。

* + - * 1. 尿素琼脂

成分

1. 蛋白胨 1 g
2. 氯化钠 5 g
3. 葡萄糖 1 g
4. 磷酸二氢钾 2 g
5. 0.4 ％酚红溶液 3 mL
6. 琼脂 20 g
7. 纯水 1 000 mL,
8. 20 ％尿素溶液 100 mL

制法

将除尿素和琼脂以外的成分配好，并校正pH值，加入琼脂，加热溶化并分装烧瓶，于121 ℃±1 ℃高压灭菌15 min。冷却至50 ℃～55 ℃，加入经除菌过滤的尿素溶液。尿素的最终浓度应为2 ％，最终pH值应为7.2±0.1。分装于灭菌试管内，放成斜面备用。

* + - * 1. 营养明胶

成分

1. 蛋白胨 5 g
2. 牛肉膏 3 g
3. 明胶 120 g
4. 纯水 1 000 ml

制法

加热溶解、校正至pH值7.4～7.6，分装小管，于121 ℃±1 ℃高压蒸汽灭菌10 min，取出后迅速冷却，使其凝固，最终pH值应为6.8～7.0。

* + - * 1. 1 ％马尿酸钠溶液

成分

1. 马尿酸钠水 1.0 g
2. 纯水 100 mL

制法

将马尿酸钠溶于水中，在121 ℃±1 ℃高压蒸汽灭菌15 min，避光保存。

* + - * 1. 5％（水合）茚三酮溶液

成分

1. （水合）茚三酮（ninhydrin） 1.75 g
2. 丙酮 25 mL
3. 丁醇 25 mL

制法

将（水合）茚三酮溶解于丙酮/丁醇混合液中。该溶液避光冷藏，最多不超过7 d。

* + - * 1. 嗜肺军团菌诊断血清

采用符合GB 4789.28要求的嗜肺军团菌诊断血清。

* + - 1. 仪器设备

微生物气溶胶浓缩器：采样流量≥100L/min,对于直径3.0μm以上粒子的捕集效率应≥80%（或浓缩比≥8).

液体冲击式微生物气溶胶采样器：采样流量7L/min~15 L/min,对于0.5μm以上粒子的捕集效率应≥90%.

离心管：容积50ml

无菌平皿（直径为9 cm）。

CO2培养箱：36 ℃±1 ℃。

紫外线灯：波长360 nm±2 nm。

涡旋振荡器。

普通光学显微镜

荧光显微镜。

水浴箱。

无菌接种环：直径3 mm。

微量移液器：100 μL、200 μL。

高压蒸汽灭菌器。

制备培养基用一般设备：量筒，锥形瓶，pH计或精密pH试纸等冰箱。

* + - 1. 样品采集和保存

|  |
| --- |
| 采样点：符合附录A的要求。采样环境条件：符合4.1.4.2的要求。采样方法：将20 mL采样吸收液1（7.1.2.1）倒人微生物气溶胶采样器（7.1.3.2）中，然后用吸管加入矿物油1滴～2滴。将微生物气溶胶浓缩器（7.1.3.1）与微生物气溶胶采样器（7.1.3.2）连接，按照微生物气溶胶浓缩器和微生物气溶胶采样器的流量要求调整主流量和浓缩流量。按浓缩器和采样器说明书操作，每个气溶胶样品采集空气量2 m3。将采样吸收液2（7.1.2.2）20 mL倒入微生物气溶胶采样器（7.1.3.2）中，然后用吸管加人矿物油1滴～2滴；在相同采样点重复以上采样步骤。样品的保存和运输：采集的样品不必冷冻，但要避光和防止受热，4 h内送实验室检验。 |

* + - 1. 实验室分析
				1. 样品的酸处理

对采样后的吸收液1和吸收液2各取1 mL，分别加人盐酸氯化钾溶液（7.1.2.3）充分混合，调pH至2.2，静置15 min。

* + - * 1. 样品的接种

在酸处理后的两种样品中分别加入1 mol／L氢氧化钾溶液，中和至pH为6.9，各取悬液0.2 mL～0.3 mL分别接种GVPC平板（7.1.2.4）。

样品的培养

将接种平板静置于浓度为5 %、温度为36 ℃±1 ℃的CO2培养箱中，培养10 d。

* + - * 1. 菌落观察

从培养第3天开始观察菌落，军团菌的菌落颜色多样，通常呈白色、灰色、蓝色或紫色，也能显深褐色、灰绿色、深红色；菌落边缘整齐，表面光滑，呈典型毛玻璃状，在紫外灯下，部分菌落有荧光，荧光的颜色有助于区分样品中军团菌的不同种类。为了避免军团菌的死亡，不能将平板长时间暴露在紫外灯下，宜在数秒内完成。

* + - * 1. 菌落验证

在GVPC培养基上2 d内生长的菌落均不是军团菌，选择3 d～10 d内生长的疑似军团菌菌落分别接种到BCYE琼脂平板（7.1.2.5）和BCYE-CYE琼脂平板（7.1.2.6）两块培养基上进行培养，如果有不同类型的疑似军团菌菌落，则每种类型应至少选择两个疑似菌落进行培养验证，置于CO2培养箱中36 ℃±1 ℃培养2 d，凡在BCYE琼脂平板上生长而在BCYE-CYE琼脂平板不生长的则为军团菌菌落。

* + - * 1. 生化培养法鉴定嗜肺军团菌

细菌形态观察：对菌落进行革兰氏染色镜检，观察细菌形态及颜色。如果菌体呈紫色，为革兰氏阳性菌；菌体呈红色，为革兰氏阴性菌。

氧化酶试验：使用铂／铱接种环或玻璃棒，挑取待测菌落于滤纸上，加一滴氧化酶试剂。如果在30s内出现紫罗兰色或深蓝色为阳性；2 min不变色为阴性。

硝酸盐还原试验：将待测菌接种到硝酸盐培养基上．于36 ℃±1 ℃培养1 d～3 d．加入甲液和乙液各一滴.观察结果。立刻或数分钟内显红色为阳性；培养基颜色无变化为阴性。

1. 本试验阴性的原因有三个：细菌不能还原硝酸盐；亚硝酸盐继续分解，生成氨和氮：培养基不适于细菌的生长。如欲检查培养基中硝酸盐是否未被分解，可再加入锌粉少许，可使硝酸盐还原为亚硝酸盐而呈现红色。

尿素酶试验：将待检菌以较大量穿刺接种在尿素琼脂培养基上，于36 ℃±1 ℃培2 h、24 h．分别观察结果。培养基变为红色为阳性；颜色不变为阴性。

明胶液化试验：将待测菌穿刺接种在明胶培养基内，于36 ℃±1 ℃培养24 h±2 h，取出放置于4 ℃±2 ℃冰箱内10 min～30 min后再观察结果。仍呈溶解状或表面溶解时即为明胶液化试验阳性；凝固不溶者为阴性。

马尿酸水解试验：挑取待测菌落，加到盛有0.4 mL 1 %马尿酸钠的试管中制成菌悬液。混合均匀后于36 ℃±1 ℃水浴中温育或36 ℃±1 ℃培养箱中培养24 h。沿着试管壁缓缓加入0.2 ml茚三酮溶液，于36 ℃±1 ℃水浴中温育或36 ℃±1 ℃培养箱中放置10 min后观察结果。15 min内溶液出现蓝紫色变化则为阳性；溶液无颜色变化或15 min之后出现蓝紫色变化为阴性。试验时为了避免假阴性需用标准菌株做阳性对照。

生化培养结果判定：染色镜检为革兰氏阴性无芽孢杆菌，且氧化酶（﹣／弱﹢），硝酸盐还原（﹣），尿素酶（﹣），明胶液化（﹢）和水解马尿酸（﹢），即可确定为嗜肺军团菌。

* + - * 1. 血清型鉴定

先挑取经生化实验判定为嗜肺军团菌的菌株用多价血清做玻片凝集试验，同时用生理盐水做对照，在生理盐水中自凝者为粗糙型菌株,不能分型。如阳性反应，再与相应的单价血清做玻片凝集试验，作出诊断。

* + - 1. 试验数据处理
				1. 结果判断

采样点测定结果：两种采样吸收液中至少有一种吸收液培养出嗜肺军团菌，即为该采样点嗜肺军团菌阳性。

* + - * 1. 结果报告

一个区域中任意一个采样点嗜肺军团菌阳性，即该区域空气中嗜肺军团菌的测定结果为阳性。

* + - 1. 质量控制

培养基和试剂需符合GB 4789.28食品安全国家标准 食品微生物学检验 培养基和试剂的质量要求，采用国内生产的成品培养基需有FSDA（中国食品药品监督管理局）批准的生产文号。对于购买的成品培养基，应注意培养基有效期。

应设置阳性对照（嗜肺军团菌 ATCC 33152）。

嗜肺军团菌是致病菌，实验操作人员应有二级生物安全防护实验室工作的实践经验，实验人员在处理或检测可疑致病菌时应采取适当的预防措施，减少职业暴露，并保证符合国家有关法规规定的要求。

* + 1. 荧光PCR检测法
			1. 适用范围

适用于嗜肺军团菌初筛试验和可疑菌落的快速鉴定试验。

* + - 1. 培养基和试剂

上游引物：5’-GAAAATAAAGTAAAAGGGGAAGCC-3’

下游引物：5’-ATCAATCAGACGACCAGTGTATTC-3’

探针：5’-FAM-AGGCGTTGTTGTATTGCCAAGTGGTT-TAMRA-3’

可使用符合GB 4789.28要求的试剂盒。

* + - 1. 仪器和设备

荧光PCR仪

离心机：不小于12000 rpm。

移液器：10 µL～100 µL.

* + - 1. 样品采集和保存

符合7.1.4的要求。

* + - 1. 实验室分析
				1. 样品前处理

吸收液：吸取采样后的吸收液1 mL加入到1 mL无菌离心管，12000 rpm 离心5 min后弃上清液，保留沉淀，加入DNA提取液50 µL将沉淀悬浮后，100 ℃煮沸５ min ，12000 rpm 离心2 min取上清液于干净的离心管中进行PCR检测。

可疑菌落：用接种环挑取单个菌落于50 µL DNA提取液中振荡混匀，100 ℃煮沸５ min，12000 rpm 离心2 min取上清液于干净的离心管中进行PCR检测。

* + - * 1. 荧光PCR检测

荧光PCR 扩增体系（25 µL）：其中PCR反应体系10 µL，上、下游引物(10 µmol/L)各1.25 µL，探针(10 µmol/L) 0.625 µL，模板5 µL，无核酸酶的去离子水补足体积至25 µL。

扩增条件：50 ℃ UNG酶处理2 min，95 ℃预变性3 min；然后95 ℃变性5 s，55 ℃退火延伸60 s，检测荧光信号，进行40个循环。

* + - 1. 试验数据处理
				1. 结果判定

阳性：样本检测结果Ct值≤ 36，有明显指数增长。

可疑：样本检测结果Ct值在36~39范围。此时应对样本进行重复检测，如重复实验结果Ct值仍在36~39范围，有明显指数增长，则判定为阳性，否则为阴性。

阴性：样本检测结果Ct值＞39或无Ct值。

两种采样吸收液中至少有一种吸收液检测结果为阳性，即为该采样点嗜肺军团菌初筛阳性。经培养后的可疑菌落检测结果为阳性，即为该采样点嗜肺军团菌阳性。

* + - * 1. 结果报告

一个区域中任意一个采样点嗜肺军团菌初筛阳性，需按7.1进行试验后再报告结果。任意采样点培养后的可疑菌落经荧光PCR检测为阳性，可判断该区域嗜肺军团菌阳性。

* + - 1. 质量控制
				1. 试剂盒有效性判定

阳性对照：Ct值≤ 30，有明显指数增长。

阴性对照：Ct值＞39或无Ct值，线形为直线或轻微斜线，无明显指数增长期和平台期。

* + - * 1. 其他质控要求

符合7.1.7的要求。

1. 50 m250 m2
2. （规范性）
现场采样检测布点要求
	1. 范围

本附录规定了公共场所空气中微生物撞击法和自然沉降法现场采样点布置的基本要求。

* 1. 撞击法采样布点要求
		1. 采样点数量

室内面积不足50 m2的设置1个采样点，50 m2～200 m2的设置2个采样点，200 m2以上的设置3个～5个采样点。

* + 1. 布点方式

采样点按均匀布点原则设置，室内1个采样点的设置在房屋的中心位置，多点采样时应按对角线或梅花式均匀布点。采样点应避开通风口、通风道和热源，离墙壁距离应大于0.5 m，离门窗距离应大于1 m。

* + 1. 采样高度

原则上应与成人的呼吸带的高度相一致，相对高度在0.5 m～1.5 m之间。在有条件的情况下，考虑坐、卧等状态的时间长短和儿童身高，选择适宜的采样高度，可增加0.3 m～0.6 m相对高度的采样。

* 1. 自然沉降法采样布点要求
		1. 采样点数量

室内面积不足50 m2的设置3个采样点，50 m2以上的设置5个采样点。

* + 1. 布点方式

采样点按均匀布点原则设置，应按对角线或梅花式均匀布点。采样点应避开通风口、通风道和热源，离墙壁距离应大于0.5 m，离门窗距离应大于1 m，如同时采集其他指标空气样品，与其它采样器距离应大于1 m。

* + 1. 采样高度

原则上应与成人的呼吸带的高度相一致，相对高度在0.5 m～1.5 m之间。在有条件的情况下，考虑坐、卧等状态的呼吸高度和儿童身高，增加0.3 m～0.6 m相对高度的采样。

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

联系人：李霞

联系电话：010-50930175；50930174

联系邮箱：lixia@neih.chinacdc.cn