退伍軍人桿菌、醫院環境監測與用水之實證探討

田霓[1,2,4]　黃馨慧[2]　陳怡伶[2]　張蕙蘭[1]　陳思淳[1]　黃高彬[3]

中國醫藥大學附設醫院　檢驗醫學部[1]　中國醫藥大學　醫學檢驗生物技術學系[2]
中國醫藥大學附設醫院　感染管制小組[3]　中興大學　獸醫學院獸醫系所[4]

本文針對退伍軍人桿菌的發現歷史、微生物特性、致病機轉、臨床疾病、流行病學等面向進行相關文獻的探討，從臨床實驗室建立退伍軍人桿菌的培養與鑑定流程，結合臨床環境採檢與檢測之實務經驗，說明採檢作業、臨床微生物實驗室接種處理、初步篩檢試驗、血清分型確認試驗到分子分型等方法，並且比較和分析各種實驗室診斷方法之優缺點，為建構退伍軍人桿菌培養和鑑定流程做一完整的說明。最後，根據國內外的文獻探討與經驗，介紹醫療機構常見環境供水系統消毒法。希望透過本文系統性的回顧，做為臨床微生物實驗室工作者與感染管制人員，有關退伍軍人桿菌監測的工作指引。（**感控雜誌 2012:22:234-242**）

關鍵詞： 退伍軍人桿菌、醫院環境監測、醫院用水

退伍軍人桿菌發現歷史

1976 年美國退伍軍人協會於費城辦活動，在活動舉辦的旅館發生肺炎大流行，造成 221 人感染，34 人死亡，故稱此未知的肺炎為「退伍軍人症」。美國疾病管制局最終只研究出此疾病的傳播途徑非經由人對人、飲食與昆蟲。直到 1977 年科學家 Joseph McDade 無意添加萃取物的天竺鼠脾臟且多培養數天後，在脾臟切片發現了棒狀桿菌，正式命名為「嗜肺性退伍軍人桿菌」[1]。

特性與致病機轉

此菌為水中常見的革蘭氏陰性桿菌，需氧具運動性，大小 0.2~20 μm ×0.3~0.9 μm。環境耐受性強，於水環境 0~63℃及 pH 5.0~8.5 間皆可存

民國 101 年 7 月 1 日受理
民國 101 年 8 月 30 日接受刊載

通訊作者：黃高彬
通訊地址：台中市育德路 2 號
連絡電話：(04) 22052121 轉 1930

活，32~45℃為最佳繁殖溫度；需有半胱胺酸 (cysteine) 才可生長[2]。目前已知有 48 類菌種，70 種血清型[3]。主要致病菌為 *L. pneumophila* serogroup 1, 4, 6, *L. micdadi, L. dumoffii* 五種，又以血清型第一型 (*L. pneumophila* serogroup 1) 高達 70% 的致病率[4]。自然宿主為阿米巴原蟲，提供退伍軍人桿菌良好的繁殖空間與養份。通常是藉由吸入此菌汙染的水源而患病，如由水龍頭、蓮蓬頭等。進入人體後會先形成 Legionella containing vacuoles (LCVs)，由呼吸道進入肺部，被巨噬細胞吞噬，粒線體分泌 Htp B 蛋白質幫助 LCVs 早期發展，並與粗糙內質網結合而增殖，同時將細胞膜變薄，導致膜的內吞標誌 (endocytic marker) 消失，因而不會促發內吞路徑，最終藉由細胞凋亡和壞死釋出[5]。

臨床症狀與流行病學

感染早期有身體不適、疲勞、厭食等類似感冒症狀，伴隨快速發燒、下痢等，接續衍生成兩種截然不同的症狀。第一種為退伍軍人症 (Legionnaires' disease)，潛伏期 2~10 天發生於肺部的多系統性疾病，X 光有肺部實質化產生，嚴重時會呈呼吸衰竭，導致死亡，因此需早期以抗生素治療。第二種為龐蒂克熱 (Pontiac fever)，為類似感冒，雖然有高達 95% 的侵襲率，但通常一週內自行痊癒。退伍軍人桿菌為伺機性桿菌，主要感染免疫力較差族群，像是中老年人、免疫力功能不全者與抽菸族群[6]。

目前在台灣退伍軍人症為第三類法定傳染病[2]。衛生署疾病管制局提供四項標準評估退伍軍人症確定病例，只要符合以下四項中的任一項實驗診斷結果，即可被判定為「退伍軍人病之確定病例」。(一) 由肺組織、呼吸道分泌物、胸膜液、無菌部位分離出退伍軍人桿菌。(二) 由免疫螢光抗體試驗，在肺組織、呼吸道分泌物或胸膜液檢驗出嗜肺性退伍軍人桿菌。(三) 以間接免疫螢光抗體試驗檢測血清抗體效價，恢復期 (4~12 週) 比發病初期效價有 4 倍以上增加，且力價≧128。(四) 以酵素連結免疫分析法或快速免疫呈色膜法，檢驗病人尿液有嗜肺性退伍軍人桿菌血清型第一型抗原[7]。

醫院中一旦有退伍軍人症確定病例出現後，首要關心的是釐清患者是否為醫院感染。退伍軍人症的潛伏期為 2~10 天，可將 10 天定為一個分界點，判定病患是否為醫院感染。目前衛生署疾病管制局統計 2008~2012 年的退伍軍人病確定病例數中，發現每年約有 50~100 例的確定病例數發生。隨著台灣都市化程度升高，休閒娛樂意識的提升，因此伴隨著游泳池、SPA 等大量興建與冷卻水塔和供水管線大量使用，導致退伍軍人桿菌確定病例呈現常態性分布，而沒有明顯的季節局限性[7]。

環境採檢與檢測

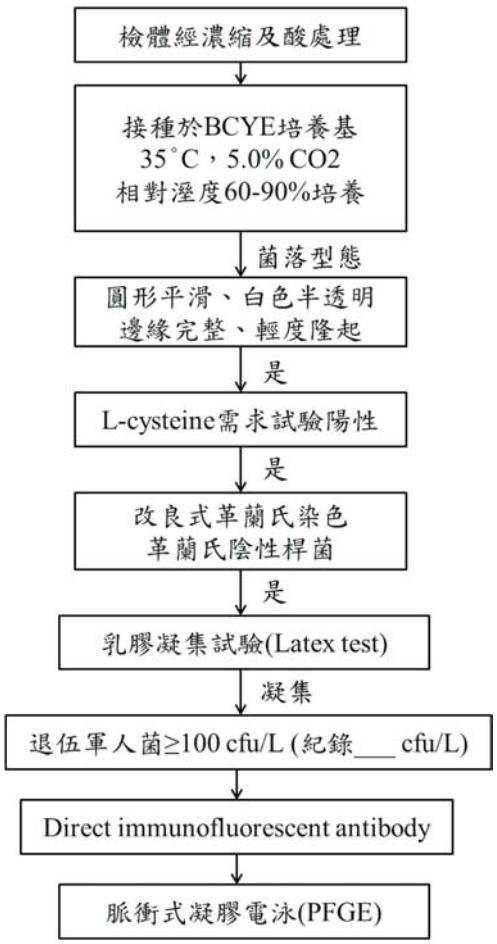
供水管線與水塔中停滯的水流與適當的水溫，提供此菌最佳生長環境，對於免疫力低弱的族群來說較易感染，且死亡率高達 50%，藉由定期環境採檢與培養，可有效監控退伍軍人桿菌存在有其重要性。衛生署疾病管制局 2010 年建議，總病床數大於 49 床的醫院，每年至少進行一次定期採檢，此外針對高風險病房 (骨髓移植病房、化學治療病房、器官移植病房)，應每半年進行一次定期環境採檢，若有院內病例產生，應立即對該單位進行環境採檢與消毒[7]。此外依據行政院衛生署疾病管制局傳染病標準檢驗方法 2006 年規定[8]，當院內有疑似病例時，配合陽性案例進行環境用水進行採樣，採取水龍頭、蓮蓬頭、飲水機、冷卻水塔等處，先以無菌棉棒沾水擦拭水龍頭或蓮蓬頭出水口處內部之生物膜數次後，折斷棉棒置於滅菌容器中，再續接 200 mL 環境水於同一容器中，最好以低溫送至實驗室進行後續培養流程。若為例行性的環境監控者，環境採集檢體主要分成以下三種：一、針對靜止水源如無運轉之冷卻水塔，採檢時應採集水面下 10 公分的水較為合適，水量約 100~1,000 ml，須注意避免採集過多的沉積物，以免造成後續檢體離心或過濾時的困擾。二、可採集運轉水塔取滴落之水，水量 300~500 ml。三、可採集運轉水，如：水龍頭、蓮蓬頭等流動水，採集時需使用放流前或放流後的水，水量 300~500 ml，若裝設過濾器或氯化器應先移除後再採檢。若採檢水檢體有氯，可使用硫代酸鈉進行中和。

實驗室診斷

以下介紹之實驗室檢測流程與方法，除了分子生物學的基因檢測外，有關鑑定流程與檢驗方法均依據疾病管制局 2006 年發行之傳染病標準檢驗方法手冊所載內容[8]，並依臨床實驗室使用的經驗進行說明：

(一) 環境檢體處理與培養：利用過濾法或離心法進行檢體濃縮，加入 HCl-KCl 振盪混合後靜置，再以 KOH 中和。接種於 BCYE agar (Buffered charcoal yeast extract agar) 及 MWY (BCYE with Dye, Glycine, Vancomycin, Polymyxin B, Anisomycin)，於 35℃、5% CO2 培養箱培養 7~14 天。接續利用乳膠凝集試驗、直接螢光抗體試驗或分子診斷法做菌種分型，並計算出陽性菌落數。以下為檢驗退伍軍人桿菌的流程圖 (如圖一)。計算：培養基上陽性菌落數/取出塗抹之水檢體體積總和。

(二) 病人檢體處理與培養常見檢體包括肺組織、胸膜積液、肺活體切片組織、呼細道分泌物。檢體處理同上。培養基有 BCYE agar 或 PNV (Buffered Charcoal Yeast Extract Agar with Polymyxin B, Natamycin,



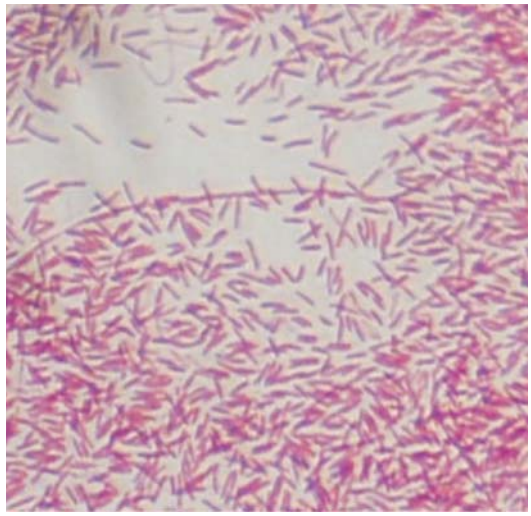
圖一　退伍軍人桿菌之環境檢體處理、培養與鑑定流程[2,7,8]

Vancomycin)，後續培養步驟同上述。

(三) 退伍軍人桿菌的菌落觀察利用生長需求與特殊染色來進行，L-cysteine 需求試驗意指在 BCYE agar 上出現圓形、邊緣平整的白色毛玻璃菌落時，針對此類型的菌落即可初步判定為退伍軍人桿菌 (如圖2)。此菌較不易染上色，故使用改良式革蘭氏染色，將第四劑改成石碳酸品紅液 (Carbofusin solution)，若觀察到革蘭氏陰性桿菌，可暫認為退伍軍人桿菌[9] (如圖3)。

(四) 退伍軍人菌乳膠凝集試驗試劑，則是利用吸附抗體藍色乳膠粒子與菌細胞壁做結合，由凝集反應與否進行退伍軍人菌血清分型，分為血清

圖二　接種於 BCYE agar 選擇性培養基，於 35℃、5% CO2 培養箱培養 7~14 天，產生圓形、邊緣平整、白色半透明的菌落。



圖三　使用改良式革蘭氏染色，退伍軍人桿菌顯微鏡下型態為革蘭氏陰性桿菌。

型第一型 *Legionella pneumophila* serogroup 1、第二到十四型 (*Legionella pneumophila* serogroup 2-14) 和其他七種 (*L. longbeachae1-2*，*L. bozemanii1-2*，*L. dumoffii*，*L. gormanii*，*L. jordanis*，*L. micdadei*，*L. anisa*)，若檢測為陽性，會有凝集現象的產生；陰性則無，但若偵測皆為陰性時，不能判定此菌落非退伍軍人桿菌，只能判定此菌落非可以偵測之退伍軍人菌種[10]。

(五) 直接螢光抗體試驗用於快速鑑定肺部組織與呼吸道分泌物中有無此菌的血清分型。其原理主要是利用帶有螢光基團的抗體與抗原進行結合，於螢光顯微鏡下觀察其菌落型態與螢光發光與否，但其缺點為其多株抗體易和如百日咳等細菌產生交叉反應，及設備與價格限制[11]。

(六) 間接免疫螢光抗體試驗法則檢測病人血清中 anti-*Legionella pneumophila* 抗體效價，若有典型菌體螢光反應，表示血清中含有 *L. preumophila* 的抗體，並由稀釋終點判定其抗體效價。病人陽性判定標準為發病初期與恢復期血清抗體力價有 4 倍以上差距，且最高力價等於或大於 1:128 以上[8]。

(七) 尿液抗原篩檢普遍使用於臨床，原理主要利用免疫色層薄膜分析法，偵測菌細胞壁上 LPS (lipopolysaccharide)。對於大規模的退伍軍人症爆發有很大的幫助，操作簡單且 15 分鐘即可知道結果。在治療上，使診斷時機大幅提前且提供更適當的抗生素治療，但此方法缺點即目前只能針對血清型第一型作偵測，其他的血清型仍無法偵測，且尿液檢體放置過久會造成偽陰性[12]。

(八) 目前許多分子診斷方法應用於環境檢測上，利用 5S rRNA 與 *mip* gene (macrophage infectivity potentiator gene) 偵測環境中的菌株，或使用 real-time PCR，可降低 PCR 常見的交叉汙染風險，也減少處理檢體與分析 PCR 結果的時間。而脈衝式凝膠電泳 (Pulse-Field gel electrophoresis, PFGE)，則是利用菌種基因體核酸的多型性，比對菌種的圖樣 (pattern) 的相似性，確認確定病例的產生或確認群突發[13]。各類臨床檢驗方法優缺點比較如表一。

常見環境供水系統消毒法

退伍軍人菌在供水系統管道轉折處及末端出水口，易形成生物膜，導致飲水及供水系統的安全疑慮。常見消毒方式分成一般系統消毒和退伍軍人群突發時可使用的重點。

一般系統消毒法中最為人所知即為銅銀離子法，利用電極板電解原理，將銅銀離子解離釋放水中，形成帶正電的陽離子，當正電陽離子被細胞壁帶負電的微生物所吸引，會造成微生物結構、滲透壓發生改變而造成菌體破裂。從西班牙的回顧 1998~2007 年的文獻中可知，每家醫

表一　各類實驗室診斷方法之優缺點比較

方法	敏感度	特異性	優點	缺點
培養				
痰液	5~70%	100%	黃金標準	培養時間需 7~14 天
支氣管肺泡灌洗液或支氣管分泌物[14]	30~90%	100%	高敏感性	檢體培養前須先進行酸化或加熱處理
乳膠凝集試驗[15]	80%	97~99%	可同時檢驗大量的檢體 反應時間快	有交叉反應 敏感性較低
直接螢光抗體試驗[16]				
肺組織切片	80~90%	99%	可用作血清分型	價格與設備的限制
呼吸道分泌物	25~75%	95~99%	第一個用來檢測肺組織切片	需菌量多 有交叉反應
尿液抗原篩檢[12]				
尿液	80%	97%	檢體取得容易 最普遍的早期快速篩檢 敏感性高	只針對一種血清型偵測 檢體放置過久會有偽陰性
PCR [17]				
呼吸道分泌物	85~92%	94~99%	檢測快速	會有偽陽性
尿液、血清	33~70%~98%		可檢測常見退伍軍人菌種	

文獻出處[13]

院使用銅銀離子消毒的裝置和期間均不同，使得銅銀離子濃度使用的情形亦不盡相同，濃度的差異很大[18]。但依據 2011 年台灣所發表的文獻，針對銅銀離子使用濃度建議維持在銅離子 200~400 μg/L 和銀離子 20~40 μg/L 的範圍內，並進行定期監控，對於退伍軍人桿菌的控制是明顯有效的[19]。在美國十六家醫院的調查發現，75% 醫院使用其他方式進行供水系統消毒，但陽性率高居不下，改使用銅銀離子；經過五年後，陽性率明顯下降，有近一半的醫院更降至 0%，且未再發生感染案例[20]。由此雖可知銅銀離子法的好處，但建構此系統需耗費較高的設置費用，則眾所皆知，因此許多醫院亦會考慮其他方法進行環境用水的消毒。

其次為二氧化氯法，透過二氧化氯含有自由基的特殊分子結構，對微生物的蛋白質進行氧化修飾，以達成殺菌效果。二氧化氯在美國環境保護署設定消毒濃度最大殘留量為 0.8 mg/L，我國環境保護署於 2006 年規定二氧化氯最大添加量為 1.4 mg/L、最大殘留量 0.7 mg/L 的範圍。約翰霍普金斯大學附屬醫院 (Johns Hopkins University Hospital) 研究結果中顯示添加二氧化氯後，第六十天退伍軍人菌陽性率從原本 40% 降至 20%，使用十七個月後，陽性率下降到 4%，可知此法須經過長時間作用，成效才明顯

[20]。但二氧化氯在熱水系統中會揮發，殘留濃度會較低，易導致供水系統殺菌效果不彰[21]。

第三為單氯氨法，殺菌機制是滲透微生物細胞壁進而去影響代謝，對於在管道間生長和生物膜有關的退伍軍人症特別有效果。但是由於會對院內血液透析的病人造成貧血，且消毒方式較為複雜，已不被使用[18]。

第四為加氯法廣泛運用在供水系統、冷卻水塔，還有游泳池、SPA 等場所。使用方式可以分成兩種，一種是高濃度劑量加氯法，濃度在 20~50 mg/L；另一種為連續式加氯法，進行持續添加維持濃度在 4~6 mg/L 的範圍內。加氯法對於管道間繁殖的退伍軍人菌效果有限，且管道易腐蝕，造成維修經費支出，很多醫院改用其他消毒方式[2]。

第五為紫外線法，其殺菌機制是打斷細菌 DNA 的雙股螺旋。義大利某醫院研究中指出，在成人心臟手術單位的供水系統中加裝紫外線消毒裝置，經過數月統計後發現退伍軍人菌陽性率下降[18]；但亦有實驗顯示，紫外線對於末端出水的殺菌效力差，因為紫外線通常安置於入水口且沒有殘留能力，對於末端出水處效力自然不足[18]。

應用於疑似退伍軍人桿菌群突發時使用的重點消毒法，通常於重症加護病房或是移植單位等住有感染高風險病人的病房。利用病房末端加裝過濾器來做預防，將過濾器裝置在水龍頭或蓮蓬頭上，利用過濾器孔徑 (0.2 μm) 將退伍軍人菌和其他水生病原菌做有效阻隔[18]。維吉尼亞州匹茲堡醫療系統 (VA Pittsburgh Healthcare System) 的研究結果顯示，未裝置過濾器的對照組，經採檢後都培養出此菌，而安裝過濾器的末端出水口，經過連續 13 天採檢，均無菌培養出來，證實過濾器在隔絕退伍軍人菌有效[20]。當有緊急狀況發生，過濾器可立刻安裝立即使用，便利性佳，但過濾器容易阻塞為其缺點[18]。

短期消毒通常使用在發生緊急狀況的時候，例如有群突發。採用短期消毒為加熱法，利用 60℃以上的熱水連續沖洗管道及遠端處，來達到殺菌功效。但是加熱法只有短期的耐受性，根據高雄榮民總醫院的研究報告指出使用加熱法進行消毒，經過十天後檢測，陽性率下降；但是經過兩個月後再重新檢測，發現陽性率有再上升趨勢，說明加熱法不具長期消毒成效[23]；另外有些建築物的熱水系統並沒有佈滿遠端管道，或是熱水溫度沒辦法達到 60℃以上，反而會造成退伍軍人菌大肆繁殖。

上述提到的各種消毒法對於控制退伍軍人桿菌都有不同成效，但是尚無一種消毒法被證實有絕對的效果，所以當醫院在評估安裝消毒系統時，必須根據醫院需求來選擇最適合的消毒方式。期待未來有便利、毒性低的消毒方式，有利退伍軍人菌控制。

結　論

供水系統中的退伍軍人菌對於醫院和病人具潛在風險，各醫院可依資源與目標，建立良好且完整的院內環境檢測、消毒政策與執行程序。而臨床微生物室亦須考量提供完善的退伍軍人菌培養以及檢驗方式，或考慮外送到有疾病管制局認可之傳染病檢驗機構，多方結合來達到有效控制退伍軍人菌之目的。

參考文獻

1. Tsai TF, Finn DR, Plikaytis BD, et al: Legionnaires' disease: clinical features of the epidemic in Philadelphia. Ann Intern Med 1979;90:509-17.
2. 行政院衛生署 (2007 年 8 月)：疾病管制局退伍軍人菌控制作業建議指引 (Guidelines for Legionella Control)。
3. Benson RF, Fields BS: Classification of the genus *Legionella*. Semin. Respir Infect 1998;13:90-9.
4. Jarraud S, et al: Legionnaires disease. Presse Med 2007;36:279-87.
5. Newton HJ, et al: Molecular pathogenesis of infections by *Legionella pneumophila*. Clin Microbiol Rev 2010;23:274-98.
6. Barry SF, et al: *Legionella* and Legionnaires' Disease: 25 Years of Investigation. Clin Microbiol Rev 2002;15:506.
7. 台灣衛生署 (2010 年). 2010 傳染病介紹-退伍軍人病疾病管制局網站摘自 http://www.cdc.gov.tw/professional/diseaseinfo.aspx?treeid=beac9c103df952c4&nowtreeid=6b7f57aafde15f54&tid=16CD29A279936655
8. 郭旭崧、吳和生等：退伍軍人疾病病原菌分離與鑑定 傳染病標準檢驗方法手冊 2006;2:40-70。
9. Crichton EP: Gram's stain for *Legionella*. Can Med Assoc J 1985;133:953-4.
10. Holliday MG: Use of latex agglutination technique for detecting *Legionella pneumophila* (serogroup 1) antibodies. J Clin Pathol 1990;43:860-2.
11. Edelstein PH, Edelstein MAC: Evaluation of the Merifluor-*legionella* immunofluorescent reagent for identifying and detecting 21 *Legionella* species. J Clin Microbiol 1989;27:2455-8.
12. Helbig J, et al: Detection of *Legionella pneumophila* antigen in urine samples by the Binax NOW. J Med Microbiol 2001;50:509-16.
13. Kool JL, et al: Strengths and limitations of molecular subtyping in a community outbreak of Legionnaires' disease. Epidemiol Infect 2000;125:599-608.
14. Naiwald M, Helbig JH, et al: Laboratory methods for the diagnosis of *Legionella* infections. J Microbiol. Methods 1998;33:59-79.
15. Harrison TG, Taylor AG: The diagnosis of Legionnaires' disease by estimation of antibody levels. In: T. G. Harrison and A. G. Taylor (ed.) A Laboratory Manual for *Legionella*, Vol. 1. Chichester, England: John Wiley and Sons, Ltd., 1988:113-35.
16. Edelstein PH, The laboratory diagnosis of Legionnaires' disease. Semin Respir Infect 1987;2:235-41.
17. Matsiota-Bernard P, Pitsouni E, et al: Evaluation of commercial amplification kit for the detection of *Legionella pneumophila* in clinical specimens. J Clin Microbiol 1994;32:1503-5.
18. Lin YE, et al: Controlling Legionella in hospital drinking water: an evidence-based review of disinfection methods. Infect Control Hosp Epidemiol 2011;32:166-73.
19. Stout JE, et al: Experiences of the first 16 hospitals using copper-silver ionization for *Legionella* control: implications for the evaluation of other disinfection modalities. Infect Control Hosp Epidemiol 2003;24:563-8.
20. Patricia JS, et al: Efficacy of new point-of-use water filter for preventing exposure to *Legionella* and waterborne bacteria. Am J Infect Control 2005;33:S20-5.
21. Srinivasan A, et al: A 17-month evaluation of a chlorine dioxide water treatment system to control *Legionella* species in a hospital water supply. Infect Control Hosp Epidemiol 2003;24:575-9.
22. Triassi M, et al: Clinical and environmental distribution of *Legionella pneumophila* in a university hospital in Italy: efficacy of ultraviolet disinfection. J Hosp Infect 2006;62:494-501.
23. Chen YS, et al: Abbreviated duration of superheatand-flush and disinfection of taps for *Legionella* disinfection. Les lear f fai 2005;33:606-10.

Environmental Monitoring and Detection of the *Legionella* SPP. in Hospitals and Water Supply Systems: An Empirical Study

Ni Tien[1,2,4], Sin- Hui Hung[2], Yi-Lin Chen[2], Hui-Lan Chung[1], Szu-Chun Chen[1], Kao-Pin Hwang[3]

[1]Department of Laboratory Medicine, China Medical University Hospital, Taichung, Taiwan
[2]Department of Medical Laboratory Science and Biotechnology, China Medical University, Taichung, Taiwan
[3]Infection control committee of China Medical University Hospital, Taichung, Taiwan
[4]Department of Veterinary Medicine, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan

We conducted a literature review of the epidemiology of and the history, microbial characteristics, pathogenesis, and clinical diseases caused by Legionella spp. Then, we share the practice experiences on clinical environment mining checked and detection. We compared various laboratory diagnostic methods, from preliminary screening tests to confirmatory tests, in order to detect the presence of Legionella. Finally, we evaluated the water-disinfection system that exists within health care organizations. The main objective of this study was to provide clinical microbial laboratory technicians with information for the prevention and control of Legionella infections.

Key words: Legionella, environmental surveillance