

國立高雄師範大學職業衛生風險評估表

系所：環境檢驗中心

實驗室名稱：環境檢驗中心

負責人：2547

填報日期：2013.11.12

實驗室作業流程概要內容：(含實驗方法、程序、儀器設備機具、材料等)

退伍軍人菌檢測簡要程序說明

一、水樣收集

無菌容器收集至少收集 300mL 水樣

二、檢體接種：

取 0.1mL 菌液接種至 BCYE、DGVP 培養基上，以 L 型玻璃棒於轉盤上推勻菌液。放置於 35°C 之潮濕培養箱中培養之。

三、挑選可疑菌落

判讀退伍軍人菌最佳時間為培養後 3~5 天內。菌落初期呈現圓形而且帶有完整的邊緣，中心部份會呈現些微切割玻璃狀及周圍呈現無色、淡虹彩粉紅或是藍色。

四、L-cysteine 需求試驗

將疑似菌落同時接種於 BAP 及 BCYE 培養基上，培養 24 小時觀察之。BCYE 培養基上會生長。BAP 培養基上不生長。

五、乳膠凝集試驗

用市售乳膠凝集試劑(Oxoid Ltd., Basingstoke, Hants, UK)鑑定嗜肺性退伍軍人菌血清型第 1 及 2-14 型。

六、直接免疫螢光染色

使用市售直接免疫螢光染劑(Monoclonal Technologies, Inc., Alpharetta GA)，進行 DFA 染色加以分別其抗原型，血清型分型之用。

若為陽性於螢光顯微鏡下，可見到亮黃綠色桿狀的退伍軍人菌。

七、儀器設備機具、材料

- (一) 量筒：100 至 2000 mL 之量筒。
- (二) 吸管：有 0.1 mL 刻度之 25 mL 市售無菌塑膠吸管。
- (三) 試管：大小約 118×17 mm 有蓋螺旋試管。
- (四) 採樣容器：容量 500 mL 無菌有蓋容器。
- (五) 冰箱：溫度能保持在 2~8°C 者。
- (六) 培養皿：拋棄式無菌塑膠製培養皿，大小為 90×15 mm。
- (七) 過濾器：能耐高溫高壓滅菌材質 250mL 過濾器。
- (八) 抽氣幫浦：真空度約 650mmHg 之真空抽氣裝置。
- (九) 濾膜：直徑 47 mm，孔徑 0.22 μm 無菌濾紙。
- (十) 精密天平：能精秤至 0.001 g。
- (十一) 二氧化碳培養箱 (CO₂ 培養箱)：能提供 2.5~5.0% CO₂，溫度能保持在 35±1°C 者。
- (十二) 高壓蒸氣滅菌鍋：壓力約 0.235MPa (2.4kgf/cm²)，溫度能維持在 121°C 滅菌 15 分鐘以上者。
- (十三) 加熱攪拌器：可調溫度，並附磁石攪拌功能。
- (十四) 鑷子：前端平滑、內側無波紋，使用前浸泡於 75% 酒精再以火燄燃燒滅菌。
- (十五) 接種環：白金或鎳鉻合金材質。
- (十六) 水浴槽：溫度能保持在約 50°C 者。
- (十七) 第二級生物安全櫃 (Class II Biological Safety Cabinet)。
- (十八) 表面電極 (surface probe) pH 計：pH 計之精密度需高於 0.1 pH 單位。
- (十九) 解剖顯微鏡：能放大 10~20 倍。
- (二十) 光學顯微鏡：能放大至 1000 倍油鏡。
- (二十一) 螢光顯微鏡：能放大至 1000 倍。
- (二十二) 紫外光燈：波長 365 nm。
- (二十三) 試管震盪器 (Vortex mixer)。
- (二十四) 馬克法藍氏濁度標準計 (McFarland nephelometer standard units)。
- (二十五) 玻片及蓋玻片：光學染色及螢光染色專用兩種。
- (二十六) 無粉末乳膠或 PVC 手套。

- (二十七) 離心機：轉速可達 3000 g，30 分鐘以上者。
- (二十八) 菌種保存管：PROTECT Bacterial Preservers，UK。
- (二十九) 計數器：最大刻度至 9999。
- (三十) 無菌接種環(10 μ L)。
- (三十一) L 型玻璃棒

八、試劑與培養皿

- (一) 去離子水
- (二) 1N KOH buffer
- (三) KCl-HCl buffer
- (四) 3% 硫代硫酸鈉(Na₂S₂O₃)
- (五) 無菌稀釋液
- (六) 1 倍磷酸鹽緩衝液(1X PBS buffer)
- (七) 75% 酒精
- (八) 革蘭氏染劑
- (九) 退伍軍人菌直接螢光抗體檢驗試劑：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)。本中心備有以下退伍軍人菌 DFA 試劑：嗜肺退伍軍人菌(*L. pneumophila*) 血清型 1-14, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14。退伍軍人菌 *Legionella species b – m*, *L. micdadei* 與, *L. longbeachae*。
- (十) 退伍軍人菌乳膠凝集試驗試劑組：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)。
- (十一) BCYE 培養基(Buffered Charcoal Yeast Extract Agar)
- (十二) DGVP 培養基 (dyes, glycine, vancomycin, and polymyxin B)

Examine primary media plates daily for 7 days with dissecting microscope

Suspicious colonies are present.

No suspicious colonies present: **Culture negative**

Characteristics (on BCYE) can be:

- round, 1 – 2 mm, glistening colony at 3 days; larger with longer incubation
- cut-glass appearance, or with appearance of white pigment;
- green, or pink-purple, iridescence in young colonies, becoming opaque with longer incubation.
- autofluorescent under UV light demonstrated by some species other than *Legionella pneumophila* (Lp)

Subculture isolate to BCYE and BAP (presumptive test).

No growth on BAP; growth on BCYE:
Presumptive positive for *Legionella*

Growth on BAP; growth or no growth on BCYE: Not *Legionella*

Autofluorescence under UV light?

Yes – Orange, red, or blue-white autofluorescence:

No autofluorescence present but has typical Lp colonial morphology
Perform Latex Agglutination Test (LAT) : Lp serogroup 1 (Lp 1), Lp serogroups 2-14 (Lp2-14)

Orange or red:
Perform Direct
Fluorescent antibody (DFA):
L. rubrilucens, *L. erythra*,
Legionella sp. IFA

Blue-white:
Perform DFA;
L. dumoffii, *L. gormanii*,
L. bozemanii, and *L. anisa*

Positive Lp1 LAT
Perform Lp1 DFA

Negative Lp1 LAT
Positive Lp2-14 LAT
Perform DFA with mTech Lp1-14
And individual mTech reagents to Lp2 -6

Negative Lp1 LAT and Lp2-14 LAT
Perform *Legionella*.sp. FA:
Remel IFA or mTech Leg. spp.

If positive
with one:
Confirm ID as
L. rubrilucens, *L. erythra*,
or *Legionella* sp.,
not *pneumophila*.

If negative:
not *Legionella*.

If positive:
With one:
Confirm ID as
that specific
species.

If negative:
Perform
Legionella .sp FA
(Remel or mTech).
If (+): Confirm
ID as *Legionella* sp.,
not *pneumophila*.
If (-): then
not *Legionella*

If equivocal or cross-reacting
With more than one reagent:
Confirm as blue-white
fluorescing *Legionella* sp., not
pneumophila

If Positive:
Confirm
as Lp1.

If Negative:
Retest LAT.
Retest DFA
using
monoclonal
subtypes of
Lp1

If Positive with:
Lp2,Lp3,
Lp4 or Lp6,
and Lp1-14

Confirm as
that specific
serogroup.

Lp1-14 and
Lp5

Retest with
DFA Lp5
and Lp8 to
differentiate
and confirm.

Lp1-14
Only

Confirm
as *L. pneumophila*,
not serogroup 1-6

If Negative:
Retest LAT.

If FA Positive:
Confirm as
Legionella sp.,
not *pneumophila*

If Negative:
Not *Legionella*

危害鑑別與風險評估表

附表	(附表一)						(附表二)				(附表三)			
	(第1項)	(第2項)	(第3項)			(第4項)	(第5項)	(第6項)		(第7項)				(第8項)
項次	區域/設備/作業	作業步驟	狀況			安全衛生危害因子說明	災害類型	現有風險控制方法		風險評估				風險等級
			例行	非例行	緊急			軟體	硬體	嚴重度S	危害發生機率P	風險控制成效C	風險 R=S×P×C	
1.	生物安全第二等級實驗室	同上表敘述	■			生物性氣霧逸散風險，已於局限空間內操作避免發生。	生物性危害	操作標準手則、設備定期檢測效能、人員教育訓練、著防護衣、口罩、手套	裝備有生物操作台	8	1	0.4	3.2	E
2.	化學藥品配置	依照所需藥品濃度配置	■			化學性氣體逸散風險，已於局限空間內操作避免發生。	化學性	操作標準手則、人員教育訓練、著防護衣、口罩、手套	裝備有化學抽氣櫃	8	1	0.4	3.2	E
3.						以下空白								
4.														