

леза работа по типированию штаммов *L. pneumophila* выявила насущную потребность в проведении системного анализа коллекционных и вновь выделяемых штаммов с тем, чтобы получить представление об эндемичных штаммах *L. pneumophila* в России. Такие характеристики для штаммов многих европейских стран, Австралии и США уже получены [5]. Созданная на основе полученных аллельных профилей база данных была бы большим подспорьем при отслеживании эпидемиологической обстановки по легионеллезу.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Edelstein P.H., Nakahama Ch., Tobin J.O. et al. Paleoepidemiologic investigation of legionnaires disease at wadsworth veterans administration hospital by using three typing methods for comparison of legionellae from clinical and environmental sources. *J. Clin. Microbiol.* 1986, 23 (6): 1121 — 1126.
2. European working group for legionella infections sequence-based typing (sbt) protocol for epidemiological typing of *Legionella pneumophila* Version 2.0, 5 January 2005.
3. Fry N.K., Bangsberg J.M., Bergmans A. et al. Designation of the european working group on legionella infection (EWGLI) amplified fragment length polymorphism types of *Legionella pneumophila* serogroup 1 and results of inter-centre proficiency testing using a standard protocol. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2002, 21 (10): 722 — 728.
4. Gaia V., Orman Fry N.K., Afshar B. et al. Consensus sequence-based scheme for epidemiological typing of clinical and environmental isolates of *Legionella pneumophila*. *J. Clin. Microbiol.* 2005, 43 (5): 2047 — 2052.
5. Huang B., Heron B.A., Gray B.R. et al. A predominant and virulent *Legionella pneumophila* serogroup 1 strain detected in isolates from patients and water in Queensland, Australia, by an amplified fragment length polymorphism protocol and virulence gene-based PCR assays. *Ibid.* 2004, 42 (9): 4164 — 4168.
6. Joly J.R., McKinney R.M., Tobin J.O. et al. Development of a standardized subgrouping scheme for *Legionella pneumophila* serogroup 1 using monoclonal antibodies. *Ibid.* 1986, 23 (4): 768 — 771.
7. Pourcel Ch., Visca P., Afshar B. et al. Identification of variable-number tandem-repeat (VNTR) sequences in *Legionella pneumophila* and development of an optimized multiple-locus VNTR analyse typing scheme. *Ibid.* 2007, 45 (4): 1190 — 1199.
8. Schoonmaker D., Heimberger T., Birkhead G. Comparison of ribotyping and restriction enzyme analysis using pulsed-field gel electrophoresis for distinguishing *Legionella pneumophila* isolates obtained during a nosocomial outbreak. *Ibid.* 1992, 30 (6): 1491 — 1498.
9. Stone B. J., Kwaik Y. A. Expression of multiple pili by *Legionella pneumophila*: identification and characterization of type ivh pilin gene and its role in adherence to mammalian and protozoan cells. *Ibid.* 1998, 66 (4): 1768 — 1775.

Поступила 10.10.07

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2008

*С.Б. Яцышина, Т.С. Астахова,  
В.В. Романенко, А.Е. Платонов,  
Ю.В. Жукова, С.И. Браславская,  
И.С. Тартаковский, Г.А. Шипулин*

#### **ПРИМЕНЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ПРИ РАССЛЕДОВАНИИ ВСПЫШКИ БОЛЕЗНИ ЛЕГИОНЕРОВ В Г. ВЕРХНЯЯ ПЫШМА**

Центральный НИИ эпидемиологии, Москва; Центр гигиены и эпидемиологии в Свердловской области, Екатеринбург; НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи, Москва

Проведен и молекулярно-эпидемиологический анализ, основанный на МЛСТ, который позволил идентифицировать источник возбудителя и его геновариант, вызвавший вспышку заболевания в г. Верхняя Пышма в июле 2007 г. Использована методика секвенирования-типирования, рекомендованная Европейским экспертным советом по надзору за легионеллезом. Не представлялось возможным полу-

*S.B. Yatsyshina, T.S. Astakhova,  
V.V. Romanenko, A.E. Platonov,  
Yu.V. Zhukova, S.I. Braslavskaya,  
I.S. Tartakovskii, G.A. Shipulin*

#### **APPLICATION OF MOLECULAR GENETIC METHODS DURING LEGIONNAIRES' DISEASE OUTBREAK IN TOWN VERKHNYYAYA PYSHMA**

Central Research Institute of Epidemiology, Moscow; Centre of Hygiene and Epidemiology of Sverdlovsk Region, Ekaterinburg; Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

The aim of the study was to perform molecular genetic analysis based on multi-locus sequence typing in order to identify source of Legionnaires' disease outbreak in town Verkhnyaya Pyshma in July 2007 and genetic profile of the causative agent. Sequence-based typing protocol recommended by European Working Group on Legionella infection (EWGLI) was used. It was not possible to obtain satisfactory results of Fla gene sequenc-

чить удовлетворительные результаты секвенирования гена Fla для всех образцов. По остальным генам полученные аллельные профили были характерны для *L.pneumophila*. Аллельные профили ДНК *L.pneumophila* от пациентов были идентичны и совпадали с ДНК *L.pneumophila*, обнаруженной в горячей воде из сети жилого дома, и отличались от ДНК *L.pneumophila*, обнаруженной в градирне, и от ДНК *L.pneumophila*, обнаруженной в смыве с душевой головки в квартире заболевшего. Показана идентичность по 5 генам ДНК *L.pneumophila*, обнаруженной в секционном материале и в горячей воде теплослеса жилого дома, что подтверждает аспирационный путь передачи инфекции через горячую воду, загрязненную возбудителем. *L.pneumophila*, обнаруженные в технической воде из градирни, в смыве из душевой головки в квартире заболевшего и в смыве из дренажного канала теплослеса, принадлежат к другим аллельным вариантам и, следовательно, не связаны с эпизодом вспышки.

Журн.микробиол., 2008, № 2, С. 23—29

Ключевые слова: легионеллы, молекулярно-генетический анализ, секвенирование ДНК

#### ВВЕДЕНИЕ

Методы молекулярного типирования микроорганизмов могут оказать значительную помощь при проведении эпидемиологических расследований для доказательства идентичности микроорганизмов, обнаруженных в клиническом материале от инфицированных людей, и подозреваемом источнике возбудителя в окружающей среде. В случае легионеллеза это крайне актуально, так как возбудитель широко распространен в природе. В этой связи, в качестве источника заражения может рассматриваться большое количество объектов (системы кондиционирования воздуха, водопровод, открытые источники воды и места проведения земляных работ). При этом в исследуемых объектах могут присутствовать легионеллы, не связанные с данным случаем заболевания, и только серотипирование до серовара или использование методов молекулярно-генетического типирования поможет определить истинный источник инфицирования и обозначить пути передачи.

Для молекулярно-генетического типирования изолятов *Legionella pneumophila* используется ряд подходов, основанных на рестрикции и ПЦР [1, 3 — 7], обладающих различной разрешающей способностью. Как правило, риботипирование, ПДРФ, ППГЭФ и AFLP обладают высокой разре-

ing for all samples. Obtained allelic profiles of other genes were typical for *L.pneumophila*. Allelic profiles of *L.pneumophila* isolated from patients were identical and matched with *L.pneumophila* DNA detected in water from hot water supply of domestic building, but differed from cooling tower's isolates and isolates from showerhead in apartment of one patient. Identity of 5 genes of *L.pneumophila* isolated from autopsy samples and from hot water of central hot water supply of domestic building confirms aspiration route of infection through hot water contaminated by the microorganism. *L.pneumophila* detected in water from cooling tower, showerhead in apartment of one patient, and from drainage canal of hot water supply station belonged to other allelic variants and, therefore, are not related with the outbreak.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2008, No. 2, P. 23—29

Key words: *Legionella*, molecular genetic analysis, DNA sequencing

шающей способностью, но результаты, полученные в разных лабораториях, трудно поддаются сравнению вследствие отсутствия четких критериев различия генетических типов, выделяемых с помощью данных методик.

В связи с этим Европейской экспертной рабочей группой по надзору за легионеллезом (EWGLI, <http://www.ewgli.org>) в качестве метода выбора рекомендован метод типирования, основанный на секвенировании фрагментов ДНК (МЛСТ) шести локусов генома легионелл, получаемых с помощью ПЦР [2]. Метод мультилокусного секвенирования-типирования как наиболее перспективный позволяет сформировать четкие критерии различия генетических вариантов (аллельных профилей) изолятов.

В работе применена рекомендованная схема мультилокусного секвенирования-типирования при расследовании вспышки легионеллеза, зарегистрированной в г. Верхняя Пышма в июле 2007 года.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

ДНК *L.pneumophila* была обнаружена в секционном материале 4 умерших с помощью тест-системы производства ЦНИИЭ и была использована для дальнейшей амплификации и секвенирования. Предвари-

Таблица 1. Используемые праймеры

Название праймера	Последовательность 5'-3'	ген	Номер референтной последовательности в GenBank	Позиция праймера*
asd-487F	ccctaattgctctaccattcagatg	asd	AF034213	487—511
Asd-1039R	cgaatgttatctgcgactatccac	asd	AF034213	1039—1062
flaA-619F	tttctctggcgcaagcttcc	flaA	X83232	619—638
flaA-846R	gctgctttggcataggcag	flaA	X83232	846—864
mip-58F	gctgcaaccgatgccac	mip	AJ496265	58—74
mip-595R	catatgcaagacctgagggaac	mip	AJ496265	595—616
mompS-492F	gacatcaatgtgaactgg	mompS	AF078136	492—509
mompS-1015R	cagaagctgcgaaatcag	mompS	AF078136	1032—1015
mompS-1116R	tgataaaattatccagccggacttc	mompS	AF078136	1116—1140
pilE-12F	caacaatcggatggaacacaacta	pilE	AF048690	12—35
pilE-453R	gctgctgactcgttatct	pilE	AF048690	453—471
proA-1090F	accatcaaatgcaattag	proA	M31884	1090—1107
proA-1553R	accataaatcaaaaagcc	proA	M31884	1553—1570

Примечание. \*Согласно референтной последовательности.

тельный скрининг образцов с объектов окружающей среды, выбранных по эпидемиологическим показателям, на наличие ДНК *L.pneumophila* проводился с помощью тест-системы производства ЦНИИЭ. Полученную в ходе анализа ДНК использовали для амплификации и секвенирования.

Амплификацию фрагментов ДНК *Legionella pneumophila* проводили по рекомендованному протоколу [2] на приборе «Терцик» (ДНК-технология) с использованием реагентов производства ЦНИИЭ. Используемые в исследовании праймеры перечислены в табл. 1.

Амплификация проводилась по следующей программе: начальная денатурация — 5 мин, далее 40 циклов с денатурацией 30 сек при 95°C, отжиг 30 сек при 55°C, элонгация 30 сек при 72°C. Секвенирование фрагментов амплификации выполняли на базе ЦНИИЭ методом «cycle sequence» с набором ABI PRISM Big Dye™ v.1.1

(Applied Biosystems, США) согласно инструкции изготовителя с использованием капиллярного автоматического секвенатора ABI-3100 PRISM Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США). Анализ нуклеотидных последовательностей выполнялся с использованием блока программ DNASTAR (SeqMan, MegAlign).

#### РЕЗУЛЬТАТЫ

Для проведения типирования использовано шесть генов, кодирующих белковые поверхностные структуры (fla, proA, pilE, mompS), факторы вирулентности (mip) и ферменты (asd), по каждому из которых к настоящему времени известно определенное количество аллелей. Ген fla (19 аллелей) кодирует белки жгутиков, ген pilE (26 аллелей) — белки пилей, ген proA (28 аллелей) — предшественник цинк-металлопротеиназы, ген mompS (37 аллелей) — основной протеин внешней мембраны. Ген asd (27 аллелей) кодирует аспартат-дегид-

Таблица 2. Показатели разрешающей способности

Название гена	Ген, использованный для анализа						D	Стандартная ошибка	95% Доверительный интервал
	flaA	pilE	asd	mip	mompS	proA			
Одиночный ген						X	0,767	0,0412	0,686 to 0,848
		X					0,791	0,0270	0,738 to 0,844
				X			0,794	0,0290	0,737 to 0,851
	X						0,825	0,0243	0,777 to 0,873
			X				0,827	0,0323	0,763 to 0,890
					X		0,848	0,0236	0,802 to 0,894
Комбинация генов	X	X					0,910	0,0205	0,870 to 0,950
	X	X	X				0,937	0,0191	0,900 to 0,975
	X	X	X	X			0,939	0,0194	0,901 to 0,977
	X	X	X	X	X		0,940	0,0195	0,902 to 0,979
	X	X	X	X	X	X	0,943	0,0196	0,904 to 0,980

Таблица 3. Результаты определения аллельных профилей

Образцы	Номер аллеля по гену				
	pilE	asd	mir	tompS	proA
Секц. мат. от 6-го БЛ	10	18	10	2	1
Секц. мат. от 6-го ГС	10	18	10	2	1
Гор. вода из ЦТП Центральный из сети жил. дома	10	18	10	2	1
Мазок из ротоглотки 6-ой ДЛ	—	—	—	2	—
Мазок из ротоглотки 6-ой ДЧ	—	18	—	—	—
Смыв с душ. нас. из кв. 6-го ДЧ	10	15	3	19	4
Культура, выд. из смыва с дрен. кан. теплопункта	10	3	28	9	4
Вода техн. в градирне	4	3	1	1	1

рогеназу, ген *mir* (34 аллеля) — протеин 24 kDa, необходимый для внутриклеточной инвазии, в том числе в резидентные макрофаги легких.

В результате типирования для каждого изолята определялся сиквенс-тип или аллельный профиль, который формировался из номеров аллелей генов, расположенных в установленном порядке (*flaA*, *pilE*, *asd*, *mir*, *tompS*, *proA*). При этом максимально теоретически возможный индекс различий — 1, а минимально возможный индекс — 0, который свидетельствует о невозможности различить разные изоляты. Использование каждого из вышеперечисленных генов позволяет различать штаммы с различной разрешающей способностью, показатели которой (D) указаны в табл. 2. Использование в анализе всех шести генов позволяет добиться разрешающей способности от 0,904 до 0,980.

Анализу подвергли 4 образца ДНК *L.pneumophila* из окружающей среды, 2 образца ДНК *L.pneumophila* из секционного материала умерших индивидов и 2 образца мазков из ротоглотки заболевших.

В процессе работы стало очевидно, что

некоторые из предложенных праймеров требуют замены или модификации, так как в ряде случаев при амплификации образовывались дополнительные неспецифические фрагменты, снижающие качество сиквенса. В частности, при амплификации гена *flaA* из секционного материала и одного из образцов воды так и не удалось получить концентрации чистого фрагмента, достаточной для секвенирования. Вследствие чего молекулярно-генетический анализ проводился для 5 генов — *pilE*, *asd*, *mir*, *tompS*, *proA*. У двух больных ДНК *L.pneumophila* была обнаружена в мазках из ротоглотки, но чувствительность праймеров для секвенирования уступает диагностическим, вследствие чего из этих образцов удалось секвенировать лишь единичные гены. Полученные аллельные профили представлены в табл. 3. Распределение аллелей генов, обладающих высокой разрешающей способностью, и нуклеотидных последовательностей данного исследования представлено на дендрограммах родства (рис. 1 — 3).

#### ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты молекулярно-генетического типирования показали идентичность по 5 генам ДНК *L.pneumophila*, обнаруженной в секционном материале и в горячей воде теплопункта жилого дома, что подтверждает аспирационный путь передачи инфекции через горячую воду, контаминированную возбудителем. *L.pneumophila*, обнаруженные в технической воде из градирни, в смыве из душевой головки в квартире заболевшего и в смыве из дренажного канала теплопункта, принадлежат к другим аллельным вариантам и, следовательно, не связаны с эпизодом вспышки.

Проведение активного мониторинга водоемов и теплосетей с использованием ПЦР и последующим молекулярно-генетическим типированием позволило бы пролить свет на эпидемическую значимость отдельных геновариантов *L.pneumophila*, которые, как показывают исследования, встречаются в источниках водоснабжения, но не вызывают заболевания. Так, факт совместного существования различных геновариантов *L.pneumophila* был зарегистрирован исследователями Oberdorfer K. et al. (2007), которые провели ретроспективное генотипирование методом рестрикции и анализа в пульсирующем поле ДНК 515 изолятов *L.pneumophila* из воды системы водо-

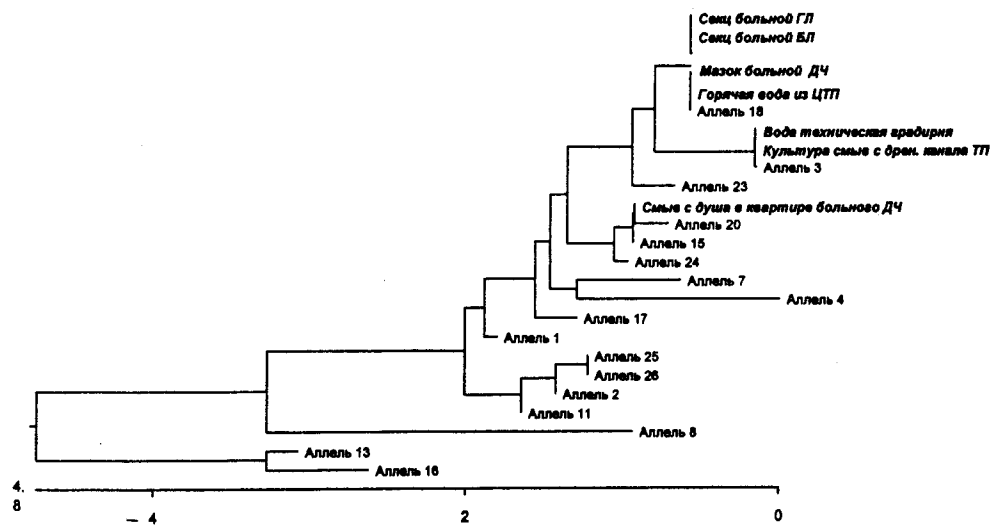


Рис. 1. Дендрограмма по гену asd.

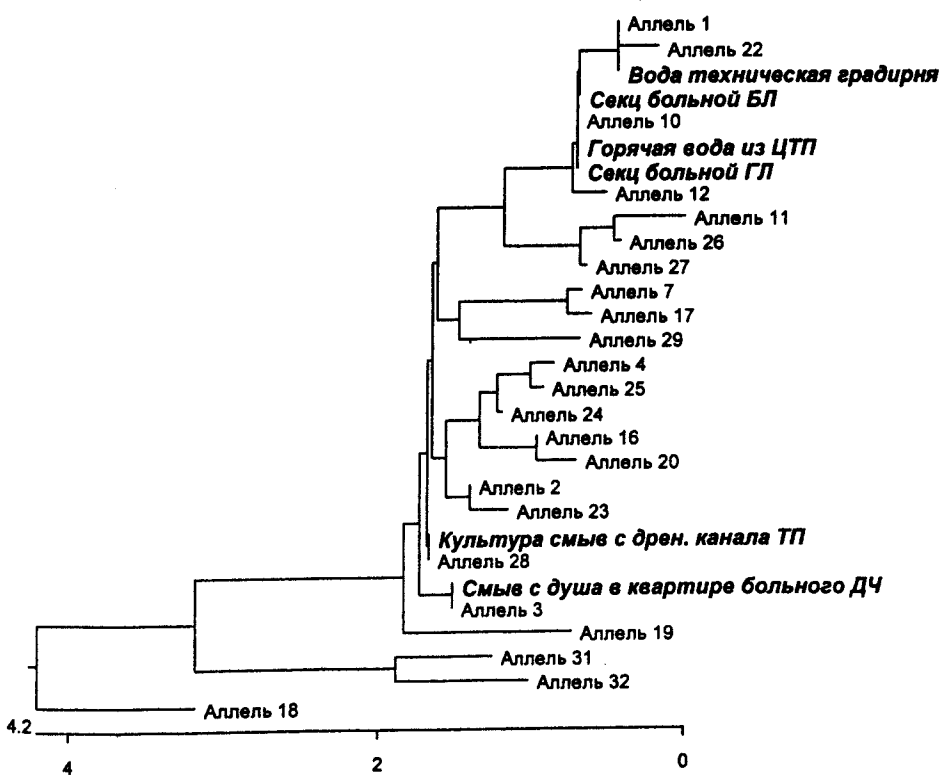


Рис. 2. Дендрограмма по гену tir.

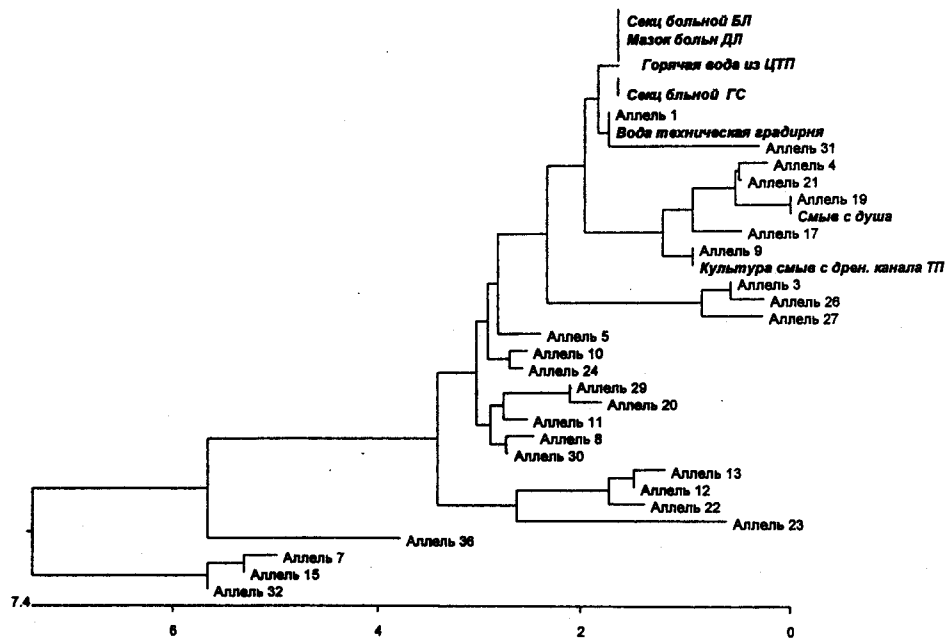


Рис. 3. Дендрограмма по гену *trpS*.

снабжения шести госпиталей за 1991 — 2001 гг. В образцах воды были обнаружены *Legionella pneumophila* семи серогрупп и 19 различных генетических профилей. Причем, в системе водоснабжения каждого госпиталя были обнаружены штаммы от 1 до 4 генетических профилей, с долговременным преобладанием одного определенного, который и был причиной случаев внутрибольничной пневмонии. Авторами было отмечено, что периодически появлялись штаммы с другими генетическими профилями, но они не доминировали, и их эпидемическое значение осталось не выясненным.

Таким образом, в результате проведенных исследований на материале со вспышки в г. Верхняя Пышма было доказано, что выделения культуры или ДНК *L. pneumophila* недостаточно для обоснований, что конкретный штамм, обнаруженный в объекте окружающей среды, является причиной заболевания людей. Дополнительно требуется проведение серотипирования до серовара или молекулярно-генетического типирования штаммов, обнаруженных в клиническом материале и в объекте окружающей среды, для доказательства их идентичности.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Fry N.K., Bangsberg J.M., Bergmans A.S. et al. Designation of the european working group on *Legionella* infection (EWGLI) amplified fragment length polymorphism types of *Legionella pneumophila* serogroup 1 and results of inter-centre proficiency testing using a standard protocol. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2002, 21: 722 — 728.
2. Gaia V., Fry N.K., Afshar B. Consensus sequence-based scheme for epidemiological typing of clinical and environmental isolates of *Legionella pneumophila*. *J. Clin. Microbiol.* 2005, 2047 — 2052.
3. Gaia V., Poloni C., Peduzzi R. Epidemiological typing of *Legionella pneumophila* with ribotyping: report of two clinical cases. *Eur. J. Epidemiol.* 1994, 10: 303 — 306.
4. Harrison T.G., Saunders N.A., Haththotuwa A. et al. Typing of *Legionella pneumophila* serogroups 2—14 strains by analysis of restriction fragment length polymorphisms. *Lett. Appl. Microbiol.* 1990, 11: 189 — 192.
5. Marques M. T., Bornstein N., Fleurette J. Combined monoclonal antibody typing, multilocus enzyme electrophoresis, soluble protein profiles and plasmid analysis of clinical and environmental *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolated in a Portuguese hospital. *J. Hosp. Infect.* 1995, 30: 103 — 110.

6. Schoonmaker D., Heimberger T., Birkhead G. Comparison of ribotyping and restriction enzyme analysis using pulsed-field gel electrophoresis for distinguishing *Legionella pneumophila* isolates obtained during a nosocomial outbreak. *J. Clin. Microbiol.* 1992, 30: 1491 — 1498.

7. Valsangiacomo C., Baggi F., Gaia V. et al. Use of amplified fragment length polymorphism in molecular typing of *Legionella pneumophila* and application to epidemiological studies. *Ibid.* 1995, 33: 1716 — 1719.

Поступила 10.10.07

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2008

С.Б.Яцышина, С.А.Портенко,  
Т.С.Астахова, Н.А.Осина, С.А.Рачина,  
С.Б.Гаранина, Ю.В.Жукова,  
А.В.Шишова, Т.Ю.Кондратьева,  
Н.С.Червякова, Т.В.Валова,  
Н.В.Иванчик, О.И.Кречикова,  
А.Л.Дурасова, А.Н.Куличенко,  
В.В.Романенко, И.С.Тартаковский,  
В.В.Малеев, Г.А.Шипулин

S.B.Yatsyshina, S.A.Portenko,  
T.S.Astakhova, N.A.Osina, S.A.Rachina,  
S.B.Garanina, Yu.V.Zhukova,  
A.V.Shishova, T.Yu.Kondratyeva,  
N.S.Chervyakova, T.V.Valova,  
N.V.Ivanchik, O.I.Krechikova,  
A.L.Durasova, A.N.Kulichenko,  
V.V.Romanenko, I.S.Tartakovskii,  
V.V.Maleev, G.A.Shipulin

#### РАЗРАБОТКА И ПРИМЕНЕНИЕ ПЦР С ГИБРИДИЗАЦИОННО-ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ДЕТЕКЦИЕЙ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ *LEGIONELLA PNEUMOPHILA*

#### DEVELOPMENT AND USE OF THE ASSAY FOR *LEGIONELLA PNEUMOPHILA* DETECTION BASED ON FLUORESCENT REAL-TIME/ENDPOINT POLYMERASE-CHAIN REACTION

Центральный НИИ эпидемиологии, Москва; Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов; Государственная медицинская академия, Смоленск; Центр гигиены и эпидемиологии в Свердловской области, Екатеринбург; НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф.Гамалеи, Москва

Central Research Institute of Epidemiology, Moscow; Russian Research Institute for Plague Control «Microbe», Saratov; State Medical Academy, Smolensk; Center of Hygiene and Epidemiology in Sverdlovsk region, Ekaterinburg; Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

Разработана тест-система для обнаружения ДНК *L.pneumophila* и *L.micdadei* в образцах объектов окружающей среды и клиническом материале из нижних дыхательных путей. Оценены ее аналитические характеристики при использовании тест-системы во время вспышки в г. Верхняя Пышма (Свердловская обл.) в июле 2007 г.: ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией, секвенирование фрагментов ДНК, клонирование фрагментов ДНК. Тест-система позволяет обнаруживать ДНК *L.pneumophila* в клиническом материале и образцах с объектов окружающей среды и определять количество ДНК бактерий в воде на основе ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией. Специфичность анализа (100%) оценивалась на панели штаммов бактерий и образцов от здоровых. Аналитическая чувствительность и предел количественного измерения — 1000 копий в 1 мл. Чувствительность анализа искусственно инфицированного биологического материала — 1000 м.к./мл. При исследовании материала со вспышки ДНК *L.pneumophila* была обнаружена в образцах легких умерших (4 из 4), мокроты (1 из 2), БАЛ (1 из 2) от больных с рентгенологическим подтверждением пневмонии; в образцах воды из сети теплогенераторов и градирни, в смывах из душевых установок в квартирах трех заболевших. В питьевой воде и воде из фонтанов ДНК

The aim of the work was to develop a PCR-based assay for detection of *L.pneumophila* and *L.micdadei* in environmental samples as well as in clinical samples from low respiratory tract and to assess its analytic characteristics. The assay was used during investigation of the outbreak developed in July 2007 in town Verkhnyaya Pyshma (Sverdlovsk region). Polymerase-chain reaction (PCR) with fluorescent detection, sequencing and cloning of DNA fragments were used. Developed assay based on the PCR with fluorescent real-time/endpoint detection is able to detect *L.pneumophila* in clinical and environmental samples and to quantify amount of bacterial DNA in water. Specificity of analysis (100%) was assessed using the panel of bacterial strains and samples from healthy individuals. Analytic sensitivity of assay and quantitation limit was 1000 GU in 1 ml. Sensitivity of the assay of artificially contaminated biological samples was 1000 bacteria in 1 ml. During outbreak investigation *L.pneumophila* DNA was detected in 4 lung samples from 4 fatal cases, from 1 of 2 sputum samples, 1 of 2 bronchoalveolar lavage samples with X-ray confirmed pneumonia. *Legionella*'s DNA was found in samples from cooling towers, central hot water supply as well as from showerheads in apartments of 3 patients. Fountain and drinking water samples were PCR-negative. Specificity of PCR-positive results was confirmed by sequencing. Use of the assay during outbreak in-