

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-

L. pneumophila не была обнаружена. Специфичность положительных результатов ПЦР доказана секвенированием ДНК. Использование тест-системы при расследовании вспышки подтвердило диагноз в случаях смертельного исхода и позволило быстро обнаружить возможный источник инфицирования.

Журн. микробиол., 2008, № 2, С. 29—37

Ключевые слова: *Legionella pneumophila*, ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени и после окончания ПЦР

ВВЕДЕНИЕ

Среди представителей рода *Legionella* выделяют 50 видов широко распространенных в природе микроорганизмов, колонизирующих простейших и одноклеточные водоросли в водоемах и формирующих биопленки в ассоциации с другими микроорганизмами в водопроводном, вентиляционном и медицинском оборудовании (<http://www.dsmz.de/bactnom>). Из них около 20 видов способны вызывать заболевания людей, при этом 70 — 90 % случаев пневмоний, вызванных легионеллами (или болезнью легионеров), спорадического или вспышечного характера развивается вследствие ингаляции или аспирации водного аэрозоля, контаминированного *L. pneumophila* 1 серогруппы [4]. Для людей со сниженным иммунитетом серьезную опасность могут представлять также *L. pneumophila* других серогрупп и другие представители рода. Например, в структуре заболеваемости внутрибольничными пневмониями в Финляндии болезнь легионеров обусловлена *L. pneumophila* 1 серогруппы только в 26 % случаев, 65 % обусловлены *L. pneumophila* других серогрупп и 9% легионеллами других видов [5].

В различных странах Европы (Испании, Италии, Турции и Франции) периодически возникают спорадические случаи и вспышки легионеллеза, преимущественно связанные с путешествиями в эти страны. С целью обнаружения, регистрации и профилактики подобных случаев, а также организации мониторинга за распространением возбудителя в объектах окружающей среды в 1986 году создана экспертная рабочая группа (EWGLI, <http://www.ewgli.org>), в которую вошли представители 37 стран, в том числе России.

В соответствии с действующими в настоящее время рекомендациями, разработанными EWGLI и ВОЗ, доказательством

investigation allowed to confirm the diagnosis in fatal cases and quickly identify the possible source of infection.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2008, No. 2, P. 29—37

Key words: *Legionella pneumophila*, PCR with fluorescent real-time/endpoint detection

содержания легионелл в окружающей среде в количестве, достаточном для инфицирования людей, является выделение культуры бактерий с подсчетом количества микробных клеток в литре исследованного образца воды. Для лабораторного подтверждения болезни легионеров обязательным является выделение культуры из образцов респираторного тракта, легких или крови, либо обнаружение в моче фильтрующегося антигена полисахаридной природы, либо подъем в 4 раза титра специфичных антител для *L. pneumophila* 1 серогруппы.

Тем не менее, перечисленные методы имеют ряд ограничений для рутинного использования, что затрудняет эпидемиологический надзор. Бактериологическое исследование длительно, и его эффективность во многом зависит от качества отбора, хранения и предварительной обработки материала, а также качества используемых бактериологических сред. Кроме того, при неправильном хранении материала из окружающей среды эти микроорганизмы могут переходить в некультивируемую форму. По данным ряда авторов чувствительность выделения культуры легионелл из образцов респираторного тракта варьирует в широких пределах от 10 до 80% [3, 15]. Результаты иммунохроматографии и иммуноферментного анализа не позволяют зарегистрировать случаи инфицирования *L. pneumophila* не серогруппы 1. Серологические тесты могут быть использованы только в качестве ретроспективной диагностики и не эффективны у людей со сниженным иммунитетом.

Для оптимизации эпидемиологического надзора требуется создание эффективных методов быстрого обнаружения *L. pneumophila* всех серогрупп в объектах окружающей среды и в клиническом материале.

ЦНИИ эпидемиологии совместно с Российским научно-исследовательским противочумным институтом «Микроб» разработана тест-система на основе ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией, позволяющая обнаруживать ДНК *L.pneumophila* в образцах из нижних дыхательных путей больных и окружающей среды, а также оценивать количество легионелл в воде. В качестве мишени для обнаружения всех серогрупп *L.pneumophila* и *L.micdadei*, второго по частоте вида, имеющего эпидемическую значимость, выбран участок гена *mip*, который кодирует протеин 24 kDa, являющийся фактором вирулентности, необходимым для внутриклеточной инвазии, в том числе в резидентные макрофаги легких. В анализе используется экзогенный и эндогенный образцы внутреннего контроля, которые позволяют контролировать качество анализа при тестировании как клинического материала, так и объектов окружающей среды. Структура олигонуклеотидных зондов, конъюгированных с флуоресцентными красителями, позволяет проводить детекцию флуоресценции как во время ПЦР, так и после окончания реакции, что позволяет использовать в качественном формате детекции простые флуоресцентные детекторы (например, Ala-1 «Биосан», Латвия). Разработанная тест-система была апробирована на образцах клинического материала и с объектов окружающей среды.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Метод качественного выявления ДНК *L.pneumophila* в клиническом материале основан на одновременной амплификации (мультиплекс-ПЦР) участка ДНК гена *mip* *L.pneumophila* и участка генома человека (эндогенный внутренний контроль). Результаты амплификации ДНК *L.pneumophila* регистрируются при измерении флуоресценции красителя JOE, а амплификации ДНК внутреннего контроля — при измерении флуоресценции красителя FAM. Эндогенный внутренний контроль позволяет не только контролировать этапы ПЦР-анализа (экстракцию ДНК и проведение ПЦР), но и оценивать адекватность забора материала, что необходимо, так как искомым возбудителем является внутриклеточным патогеном.

Метод выявления ДНК *L.pneumophila* в объектах окружающей среды основан на одновременной амплификации (мульти-

плекс-ПЦР) участка ДНК гена *mip* *L.pneumophila* и неконкурентного количественно охарактеризованного и стандартизованного экзогенного внутреннего контрольного образца (ВКО-FL), который добавляется в каждую пробирку на этапе экстракции ДНК. Результат амплификации ДНК экзогенного внутреннего контроля регистрируется по каналу FAM.

Для определения количества копий ДНК *L.pneumophila* и ДНК экзогенного внутреннего контрольного образца реакция проводится в формате детекции в режиме реального времени с использованием количественно охарактеризованных калибраторов, сконструированных с использованием методов клонирования ДНК в pGEM. Учет потерь ДНК экзогенного внутреннего контрольного образца позволяет рассчитать реальную концентрацию ДНК *L.pneumophila* в каждом исследуемом образце воды. При выполнении расчетов учитывается степень концентрации воды.

Расчет концентрации ДНК *L.pneumophila* ($C_{\text{ДНК Лр}}$) в 1 л воды проводится по формуле:

$$C_{\text{ДНК Лр}} (\text{копий/л}) = K_{\text{ДНК Лр}} / K_{\text{ВКО-FL}} \times C_{\text{ВКО-FL}} \times 2, \text{ где}$$

$C_{\text{ДНК Лр}}$ (копий/л) = количество копий ДНК *L.pneumophila* в 1 л образца воды, $K_{\text{ДНК Лр}}$ (копий/мл) = расчетное количество копий ДНК *L.pneumophila* в 1 мл тестируемой пробы, $K_{\text{ВКО-FL}}$ (копий/мл) = расчетное количество копий ДНК ВКО-FL в 1 мл внутреннего контрольного образца в тестируемой пробе, $C_{\text{ВКО-FL}}$ (копий/мл) = количество копий ДНК ВКО-FL в 1 мл внутреннего контрольного образца (значение указано во вкладыше к тест-системе), 2 — коэффициент пересчета, учитывающий изменение объемов при фильтрации, выполненной по инструкции к тест-системе.

В работе использовался следующий материал: бактерии рода *Legionella* (*L.pneumophila* Philadelphia 1 ATCC 33152, *L.pneumophila* Togus ATCC 33154, *L.pneumophila* Bloomington ATCC 33155, *L.dumoffii* Tex-KL, *L.longbeachae*); 78 культур микроорганизмов из родов *Bacillus*, *Citrobacter*, *Corynebacterium*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Francisella*, *Klebsiella*, *Listeria*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Yersinia*; суспензия ткани легких мышей, кровь (50 образцов) и мазки со слизистых носоглотки и ротоглотки (55 образцов), бронхоальве-

олярный лаваж (1 образец), моча (30 образцов) от практически здоровых индивидов; мокрота от пациентов (16 — 87 лет), госпитализированных в клиники Смоленска с диагнозом внебольничная пневмония (200 образцов); материал от 133 человек во время вспышки легионеллеза в г. Верхняя Пышма — всего 230 образцов, в т.ч. 109 ротоглоточных смывов, 2 образца мокроты, 2 образца бронхоальвеолярного лаважа, 51 образец плазмы крови, 63 образца сыворотки крови, 8 образцов мочи; 10 образцов секционного материала (суспензии легких и селезенки) от 4 умерших пациентов; 81 проба из окружающей среды (водопроводная вода горячая и холодная, вода колодецев, фонтанов и открытых водоемов, вода техническая из градирни, смывы с внутренних поверхностей труб и душевых насадок).

Клинический материал подвергался предварительной обработке.

Образцы промывных вод бронхов (бронхоальвеолярный лаваж) центрифугировали при 10 тыс. об/мин 10 мин. Надосадочную жидкость отбирали, и осадок ресуспендировали в 100 мкл оставшейся жидкости. Полученная суспензия (50 мкл) использовалась для экстракции ДНК.

Мокроту подвергали обработке с помощью реагента «Муколизин» производства ЦНИИЭ по инструкции к реагенту и использовали для экстракции ДНК в количестве 50 мкл.

Секционный материал гомогенизировали с использованием стерильных фарфоровых ступок и пестиков, после чего готовили 10% суспензию на стерильной фосфатно-буферной смеси. Суспензия декантировалась в течение 1 — 3 мин. Супернатант (50 мкл) использовался для экстракции ДНК. Моча использовалась без предварительной обработки. При работе с культурами легионелл колония ресуспендировалась в 0,5 мл фосфатно-буферной смеси. Для исследования использовали 50 мкл суспензии.

Отбор и подготовка проб с объектов окружающей среды проводилась в соответствии с МУК 4.2.2217-07 «Выявление бактерий *L.pneumophila* в объектах окружающей среды». Вода в объеме 0,5 л предварительно фильтровалась с помощью стеклянной воронки через бумажный фильтр. Затем фильтрат пропусклся через мембранный фильтр из ацетата целлюлозы с диаметром пор 0,45 мкм на установке вакуумной фильтрации «Sartorius» (Россия). Пос-

ле окончания фильтрации мембранный фильтр измельчался обожженными в пламени горелки ножницами (в одноразовую чашку Петри) и помещался обожженным в пламени горелки пинцетом в пробирки объемом 1,5 мл с 1 мл физиологического раствора. Пробирки инкубировались при комнатной температуре в течение 15 — 20 мин. при периодическом перемешивании на вортексе. Полученная суспензия (50 мкл) использовалась для экстракции ДНК по инструкции к тест-системе.

Смывы с объектов окружающей среды отбирали зондами с тампонами, смоченными стерильным физиологическим раствором. Рабочая часть зонда с тампоном помещалась в пробирку объемом 1,5 мл с 0,5 мл стерильного физиологического раствора, остальная часть зонда отламывалась и удалялась. Для исследования использовалось 50 мкл раствора.

Постановку реакции ПЦР осуществляли по инструкции к тест-системе «АмплиСенс *Legionella pneumophila-Fl*» с детекцией в режиме реального времени на приборах RotorGene 3000 или 6000 (Corbett Research, Австралия) или на амплификаторах «GeneAmp 2700» (Applied Biosystems, USA) с детекцией после окончания ПЦР на приборе Ala-1 (Бюсан).

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 при использовании автоматического анализатора ABI-3100 PRISM (Applied Biosystems, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Оценка аналитических характеристик тест-системы проводилась на базе Российского научно-исследовательского противочумного института «Микроб». Чувствительность анализа определяли с использованием бактериальных суспензий *L.pneumophila* 1 — 3 серогрупп (Philadelphia 1 ATCC 33152, Togus ATCC 33154, Bloomington ATCC 33155), содержащих 1×10^2 — 1×10^5 м.к./мл, и проб биологического материала (бронхоальвеолярный лаваж, кровь, суспензия ткани легких, моча), контаминированного легионеллами до конечной концентрации 1×10^2 — 1×10^5 м.к./мл. Чувствительность анализа при тестировании культур *L.pneumophila* составила 100 м.к. в 1 мл тестируемой бактериальной суспензии. При тестировании искусствен-

но инфицированного биологического материала чувствительность анализа составила 1000 м.к. в 1 мл пробы материала. Положительный сигнал был зафиксирован только при анализе проб, содержащих *L. pneumophila*. Специфичность анализа составила 100%. При тестировании микроорганизмов других родов (78 штаммов) и видов рода *Legionella* (*L. dumoffii* Tex-KL, *L. longbeachae*), а также клинического материала от здоровых людей (136 образцов) во всех случаях отмечен отрицательный результат.

Для оценки аналитических характеристик количественного анализа проведены эксперименты по определению линейного диапазона измерения, предела детекции, предела количественного измерения с использованием количественно охарактеризованных препаратов рекомбинантных плазмид. Линейный диапазон измерения ДНК *L. pneumophila* определялся путем двукратного тестирования препарата рекомбинантной плазмиды в различных концентрациях (составил от 100 копий ДНК/мл до 5×10^6 копий ДНК/мл, $R^2=0,99$, эффективность амплификации 1,0). Аналитическая чувствительность анализа совпала с пределом количественного измерения и составила 1000 копий ДНК/мл. Линейный диапазон измерения ДНК внутреннего контрольного образца определяли путем двукратного тестирования препарата рекомбинантной плазмиды в различных концентрациях (составил от 500 копий ДНК/мл до 10^5 копий ДНК/мл, $R^2=1,0$, эффективность амплификации 0,97).

Воспроизводимость количественного анализа оценивалась в эксперименте на образцах фильтратов воды из г. Верхняя Пышма. С этой целью троекратно тестировались 5 образцов смывов с фильтров, в которых в качественном анализе была обнаружена ДНК *L. pneumophila*. Результаты этого эксперимента, представленные в табл. 1, показали, что при содержании в образце ДНК *L. pneumophila*, начиная с $5,0 \times 10^3$ копий/л, образец стабильно определялся как положительный и расчетное количество ДНК варьировало с коэффициентом вариаций, не превышавшим 21%.

Тест-система была апробирована на базе Государственной смоленской медицинской академии на 200 образцах мокроты от пациентов, госпитализированных в клинику г. Смоленска с сентября 2006 года по апрель 2007 года с диагнозом пневмонии, подтвержденной рентгенологически. Одновременно этот же материал был иссле-

Таблица 1. Воспроизводимость результатов количественной ПЦР

Но- мер образ- ца	Расчетная концентрация ДНК <i>L. pneumophila</i> (копий/л)			Среднее значение (копий/л)	Кэф- фици- ент вариация (%)
	Первое иссле- дование	Второе исследование	Третье исследование		
1	1951	553	отрицательно	$1,3 \times 10^3$	—
2	1067	769	1106	$9,8 \times 10^2$	19
3	1976	отрицательно	1729	$1,9 \times 10^3$	—
4	13954	12982	9177	$1,2 \times 10^4$	21
5	7486	5576	5062	$6,0 \times 10^3$	21

дован с помощью стандартного бактериологического анализа. Положительный ответ в ПЦР зафиксирован в двух пробах (1,0%), тогда как выделить культуру *L. pneumophila* ни в одном случае не удалось. Один из положительных образцов представлял собой индуцированную мокроту. Типичная причинно-значимая бактериальная флора, вызывающая пневмонию (*Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*), в данных образцах также не была обнаружена с помощью стандартного бактериологического анализа. Отсутствие других атипичных возбудителей пневмонии — *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae* в этих образцах было показано с помощью ПЦР тест-системы с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени (ЦНИИЭ). Для верификации результатов ПЦР-анализа было проведено секвенирование полученных фрагментов амплификации. Установлено полное соответствие нуклеотидной последовательности ПЦР-продукта фрагменту гена *mpir* *L. pneumophila*, фланкированному использованными в тест-системе праймерами.

Разработанная тест-система была использована при расследовании вспышки внебольничной пневмонии в г. Верхняя Пышма в июле 2007 года. Тестированию подвергся как клинический материал (секционный материал, мокрота, сыворотка крови, моча), так и образцы из внешней среды (вода, смывы с душевых головок). Результаты анализа представлены в табл. 2, 3.

При исследовании материала со вспышки ДНК *L. pneumophila* обнаружена в секционном материале от 4 умерших (в 4 фрагментах легких и 1 образце селезенки), в одном из двух тестированных образцов свободно отходящей мокроты и в одном из двух образцов бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ). При этом положительный обра-

Таблица 2. Результаты тестирования образцов клинического материала

Код больного	Тяжесть заболевания	Культура	АГ	Результаты ПЦР-анализа*					
				моча	сыворотка	мазок	мокрота	БАЛ	аутопат
БЛ	крайне	+	нт	нт	нт	нт	нт	нт	+
БЧ	тяжелое	нт	нт	нт	нт	нт	нт	нт	+
ГС		—	нт	нт	нт	нт	нт	нт	+
МХ		—	+ (6)	- (6)	- (8)	нт	нт	+ (8)	+
ДЛ	тяжелое	нт	+	- (5)	+ (7)	+ (5)	нт	нт	нт
ДЧ		нт	+	- (9)	- (9)	+ (9)	нт	нт	нт
КЛ		нт	нт	нт	нт	- (6)	нт	нт	нт
ЛТ		нт	+	+ (9)	нт	- (9)	нт	нт	нт
МН		нт	+	- (9)	- (9)	- (9)	нт	нт	нт
РС		нт	+	- (10)	- (10)	нт	нт	- (12)	нт
СЛ		нт	+	- (9)	- (11)	- (9)	нт	нт	нт
СД		нт	нт	- (11)	- (11)	- (11)	нт	нт	нт
ОЗ	средней	нт	нт	- (3)	- (3)	- (3)	+ (3)	нт	нт
РН	тяжести	нт	нт	нт	- (11)	- (11)	- (11)	нт	нт
ШД		нт	нт	нт	нт	+ (2)	нт	нт	нт

Примечание. АГ — результат определения антигена в моче (Binax), * день сбора клинического материала после начала болезни, нт — исследование не проводилось.

зец БАЛ был получен от впоследствии умершего пациента, и исследованный секционный материал также содержал ДНК *L.pneumophila*. Методом ПЦР в одном из 8 образцов мочи была обнаружена ДНК *L.pneumophila*. Образцы секционного материала от трех умерших и те же 8 образцов мочи были исследованы в лаборатории легионеллезов НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф.Гамалеи. Из одного образца легочной ткани была выделена культура *L.pneumophila* 1 серогруппы, в 7 образцах мочи был обнаружен фильтрующийся антиген полисахаридной природы, специфичный для *L.pneumophila* 1 серогруппы (Binax, США). С помощью ПЦР было протестировано 109 мазков из ротоглотки, из них в трех была обнаружена ДНК *L.pneumophila*. Мазки с задней стенки глотки, в которых была обнаружена ДНК возбудителя, получены на 2 — 9 день заболевания от двух пациентов с тяжелым течением заболевания и одного пациента с заболеванием средней тяжести. У одного из этих пациентов с тяжелым течением заболевания ДНК *L.pneumophila* была обнаружена также в сыворотке крови. В остальных 51 образцах плазмы крови и 62 образцах сыворотки крови ДНК *L.pneumophila* не была обнаружена. Нужно отметить, что из всех образцов крови и мазков из ротоглотки до 10 дня после начала болезни были собраны только 49 и 28 соответственно, причем в большинстве случаев клинический материал собирался уже после приема пациентами антибиотиков нового поколения с широким спектром действия.

Таблица 3. Результаты тестирования образцов из окружающей среды, в которых обнаружена ДНК *L.pneumophila* (Верхняя Пышма)

Тип образца (адрес)	Концентрация (копий ДНК/л)
Вода из разводящей сети завода «Уралэлектромедь»	1,5x10 ³
Вода из разводящей сети в душевой казармы в/ч 74291	1,3x10 ⁴
Вода из разводящей сети в душевой казармы в/ч 74291	1,0x10 ³
Вода техническая из т/провода оборотного водоснабжения завода «Уралэлектромедь»	1,3x10 ⁴
Вода техническая из чаши градирни второго цикла завода «Уралэлектромедь»	3,0x10 ⁴
Вода техническая оборотная в градирне завода «Уралэлектромедь»	2,3x10 ⁴
Горячая вода из теплопункта (ул. Петрова)	2,5x10 ³
Теплопункт (ул. Юбилейная, 13)	1,2x10 ³
Горячая вода из теплопункта «Новорудничный»	1,3x10 ³
Горячая вода из теплопункта «Типография»	2,4x10 ³
Горячая вода из разводящей сети (ул. Орджоникидзе)	9,8x10 ²
Вода техническая из градирни	1,9x10 ³
Вода из чаши градирни второго цикла оборотного водоснабжения завода «Уралэлектромедь»	1,2x10 ⁴
Горячая вода от ЦТП «Горновский» из сети жилого дома (ул. Петрова)	2,9x10 ³
Горячая вода от ЦТП «Центральный» из сети жилого дома (ул. Кривоусова)	6,0x10 ³
Душевая насадка в квартире пациента (ул. Кривоусова)	+
Душевая насадка в квартире пациента (ул. Юбилейная)	+
Душевая насадка в квартире пациента (ул. Красноармейская)	+

При исследовании образцов с объектов окружающей среды, собранных эпидемиологами в различных местах города Верхняя Пышма, ДНК *L. pneumophila* была обнаружена в 15 из 81 проб. Секвенирование фрагментов амплификации выявило полное соответствие его нуклеотидной последовательности фрагменту гена *mp* *L. pneumophila*. Положительные образцы включали пробы технической воды из градирни (4) и воду разводящей сети с территории завода ОАО «Уралэлектромедь» (2); пробы горячей воды из тепловых пунктов (6) и разводящей сети (3). Кроме того, ДНК *L. pneumophila* выявлена в 3 из 22 смывов с душевых насадок, взятых в квартирах людей, проживающих в городе Верхняя Пышма и госпитализированных с диагнозом «пневмония неуточненная». В лаборатории легионеллезов НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи была выделена культура *L. pneumophila* 1 серогруппы из одного смыва с поверхности дренажно-го канала тепловых пунктов.

ОБСУЖДЕНИЕ

Для проведения ПЦР-анализа с целью обнаружения ДНК *Legionella* spp. предпринимаются попытки использовать ряд генов-мишеней генома микроорганизма, которые имеют свои преимущества и недостатки. Последовательности генов, кодирующих 5S и 16S рибосомальные РНК, имеют высокую гомологию у представителей различных родов и видов бактерий, родственных с *Legionella* spp., вследствие чего ставится под сомнение специфичность тестов, направленных на обнаружение рибосомальных генов [7, 12]. Например, ряд авторов сообщает о том, что попытки использовать в качестве мишени для ПЦР 5S рибосомальную РНК *Legionella* spp. показали невозможность избавиться от перекреста с бактериями родов *Pseudomonas* и *Methylobacterium* [6, 13]. Cloud J.L. et al. [2] предложили тест на обнаружение гена, кодирующего 5S рибосомальную РНК, *Legionella* spp., который, как показали дальнейшие исследования, обладал специфичностью 93%, и для подтверждения анализа необходимо было использовать последующее секвенирование фрагментов ПЦР, что позволило увеличить специфичность анализа до 98%. В последнее время для детекции бактерий рода *Legionella* используется ген, кодирующий 16S рибосомальную РНК, но, тем не менее, не представляется возможным создать такой тест,

который бы на основе этой мишени позволял обнаруживать все встречающиеся в природе виды легионелл без потери специфичности анализа [12]. В связи с этим, к результатам тестирования материала из респираторного тракта и крови с помощью ПЦР при использовании в качестве мишени генов рибосомальных РНК нужно относиться с осторожностью, принимая во внимание возможность получения ложноположительных результатов вследствие сочетания высокой чувствительности и ограниченной специфичности теста с возможностью присутствия в образцах условно патогенной микрофлоры и бактерий из окружающей среды, например, при несоблюдении условий стерильности при взятии материала. Кроме того, гены 5S и 16S рибосомальных РНК находятся в геноме в нескольких копиях, причем точное их количество на 1 геном у разных видов не известно [13], в связи с чем их количество нельзя соотносить с количеством бактерий, и, следовательно, эти мишени не подходят для количественного анализа содержания возбудителя в воде. В качестве альтернативного подхода используется мишень, в которой можно выбрать районы, позволяющие добиться 100% специфичности при обнаружении конкретных видов *Legionella*, например ген *mp* [14]. Нами была разработана тест-система, в которой в качестве мишени для обнаружения всех серогрупп *L. pneumophila* и *L. micdadei* используется ген *mp*. Ген *mp* содержится в одной копии в геноме легионелл, поэтому определяемое количество копий ДНК соответствует количеству бактерий в исследуемой пробе воды. Результаты апробации подтвердили параметры тест-системы и высокую воспроизводимость количественного анализа.

Использование ПЦР-анализа позволило определить частоту внебольничных пневмоний, вызванных *L. pneumophila* в Смоленске, которая составила 1%. Полученные данные сопоставимы с показателем распространенности внебольничных пневмоний, вызванных *L. pneumophila* в Германии (3,4%), который был получен по результатам тестирования антигена в моче [11]. ПЦР-анализ позволил подтвердить диагноз у четырех пациентов, умерших от болезни легионеров во время вспышки в г. Верхняя Пышма, и обнаружить ДНК *L. pneumophila* у 4 пациентов с тяжелым течением заболевания и у двух — в состоянии средней тяжести. Надо отметить, что

легионеллы являются внутриклеточным патогеном, локализуясь в макрофагах легочной ткани, поэтому такой клинический материал, как мазки из верхних дыхательных путей, моча и кровь не является оптимальным для исследования. Для проведения как бактериологического, так и ПЦР исследования необходимо получение БАЛ или индуцированной мокроты, так как мокрота самостоятельно отходит у больных легионеллезной пневмонией менее чем в 50% случаев [9]. ДНК возбудителя может быть обнаружена в мазках с задней стенки глотки, моче и плазме крови пациентов, но в незначительном проценте случаев. В связи с этим, исследование данного материала показано только при невозможности получения мокроты, аспирата и БАЛ, при этом отрицательный результат исследования данного материала нельзя считать окончательным. Если же ДНК *L.pneumophila* обнаружена в мазках с задней стенки глотки, моче и плазме крови пациентов, положительный результат можно считать окончательным, так как тест обладает специфичностью 100% и более чувствителен, чем бактериологическое исследование. Полученные данные показывают, что диагностическую чувствительность ПЦР-анализа можно увеличить, если собирать клинический материал в более ранние сроки после начала болезни (до начала терапии антибиотиками); при этом ДНК преимущественно обнаруживается в крови и моче у пациентов с более тяжелым течением болезни. У 9 пациентов в данном исследовании наблюдалось тяжелое течение заболевания, и преимущественно у этих пациентов ДНК *L.pneumophila* была обнаружена в моче, сыворотке или мазках с задней стенки глотки, что может свидетельствовать о связи между возможностью обнаружения ДНК возбудителя вне легочной ткани и тяжестью течения заболевания. По мнению ряда авторов, тестирование нескольких (2 — 3) образцов сыворотки от одного пациента и проведение исследования в более ранние сроки (до 10 дней) после появления симптомов позволяет увеличить чувствительность обнаружения ДНК *Legionella* spp. [5]. Diederens B.M.W. et al. отмечают, что при тестировании двух образцов сыворотки от каждого пациента с подтвержденной болезнью легионеров авторам удалось обнаружить ДНК *Legionella* spp. у 30 — 50% пациентов [3].

Применение ПЦР-анализа способствовало быстрому проведению эпидемиологи-

ческого расследования вспышки в г. Верхняя Пышма. ДНК *L.pneumophila* не была обнаружена в системе снабжения города питьевой водой и в воде главного городского фонтана, что позволило быстро исключить два из предполагаемых путей передачи, в то же время, обнаружение ДНК *L.pneumophila* в системе горячего водоснабжения подтвердило ранее высказанную версию и позволило своевременно провести противоэпидемические мероприятия. В соответствии с действующими в настоящее время рекомендациями (EWGLI, МУК 4,2,2217-07) ПЦР может быть использована для быстрого скрининга образцов с объектов окружающей среды, но положительный результат ПЦР при исследовании клинического материала является предварительным. Тем не менее, результаты опубликованных в настоящее время исследований позволяют оценить возможности применения современных разновидностей ПЦР-анализа в схеме эпидемиологического надзора за легионеллезом и рекомендовать использовать его более широко [1, 8, 10, 13] для количественной оценки содержания бактерий в воде. Представленные в работе результаты исследования подтвердили эффективность использования разработанной тест-системы для тестирования проб с объектов окружающей среды с целью мониторинга, выяснения источников заражения людей *L.pneumophila* при проведении эпидемиологического расследования и подтверждения диагноза при исследовании материала из нижних дыхательных путей или секционного материала в случае смертельного исхода. Полученные данные позволяют предполагать, что использование разработанной тест-системы для мониторинга объектов водоснабжения, кондиционирования воздуха и медицинского оборудования позволит повысить эффективность надзора за заболеваниями, вызванными *L.pneumophila*.

Часть исследований была финансирована грантом НТИ/МФТИ № 00012.00046.

ЛИТЕРАТУРА

1. Behets J., Declerck P., Delaet Y. Development and evaluation of a Taqman duplex real-time PCR quantification method for reliable enumeration of *Legionella pneumophila* in water samples. *J. Microbiol. Meth.* 2007, 68 (1): 137 — 144.
2. Cloud J.L., Carroll K.C., Pixton P. et al. Detection of *Legionella* species in respiratory specimens using PCR with sequencing confirmation. *J. Clin. Microbiol.* 2000, 38: 1709 — 1712.

3. Diederens B.M.W., de Jong C.M.A., Kluytmans J.A.J.W. et al. Detection and quantification of *Legionella pneumophila* DNA in serum: case reports and review of the literature. *J. Med. Microbiol.* 2006, 55: 639 — 642.
4. Fields B.S., Benson R.F., Besser R.E. Legionella and legionnaires' disease: 25 years of investigation. *Clin. Microbiol. Rev.* 2002, 15: 506 — 526.
5. Lindsay D.S.J., Abraham W.H., Findlay W. Laboratory diagnosis of legionnaires' disease due to *Legionella pneumophila* serogroup 1: comparison of phenotypic and genotypic methods. *J. Med. Microbiol.* 2004, 53: 183 — 187.
6. Mahbubani M.H., Bej A.K., Miller R. et al. Detection of *Legionella* with polymerase chain reaction and gene probe methods. *Mol. Cell. Probes.* 1990, 4: 175 — 187.
7. Maiwald M., Schill M., Stockinger C. et al. Detection of *Legionella* DNA in human and guinea pig urine samples by the polymerase chain reaction. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 1995, 14: 25 — 33.
8. Miller L. A., Beebe J. L., Butler J. C. et al. Use of polymerase chain reaction in an epidemiologic investigation of Pontiac fever. *J. Infect. Dis.* 1993, 168: 769 — 772.
9. Murdoch D. R. Diagnosis of *Legionella* infection. *Clin. Infect. Dis.* 2003, 36: 64 — 69.
10. Rantakokko-Jalava K., Jalava J. Development of conventional and real-time PCR assays for detection of legionella dna in respiratory specimens. *J. Clin. Microbiol.* 2001, 39 (8): 2904 — 2910.
11. Ruf B., Schürmann D., Horbach I. Prevalence and diagnosis of *Legionella* pneumonia: a 3-year prospective study with emphasis on application of urinary antigen detection. *J. Infect. Dis.* 1990, 162 (6): 1341 — 1348.
12. Stolhaug A., Bergh K. Identification and differentiation of *Legionella pneumophila* and *Legionella* spp. with real-time PCR targeting the 16s rRNA gene and species identification by mip sequencing. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006, 72 (9): 6394 — 6398.
13. Wellinghausen N., Frost C. Detection of *Legionellae* in hospital water samples by quantitative real-time lightcycler PCR. *Ibid.* 2001, 67 (9): 3985 — 3993.
14. Wilson D. A., Yen-Lieberman B., do Reischl U. Detection of *Legionella pneumophila* by real-time PCR for the mip gene. *J. Clin. Microbiol.* 2003, 41 (7): 3327 — 3330.
15. World Health Organization. Legionnaires' disease, Europe, 1998. *Wkly. Epidemiol. Rec.* 1999, 74: 273 — 277.

Поступила 10.10.07

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2008

И.А.Дятлов, И.Г. Шемякин, В.А.Баннов, С.С.Ветчинин, М.В.Храмов

I.A.Dyatlov, I.G.Shemyakin, V.A.Bannov, S.S.Vetchinin, M.V.Khramov

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ И ИММУНОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ШТАММОВ ВОЗБУДИТЕЛЯ ЛЕГИОНЕЛЛЕЗА, ВЫДЕЛЕННЫХ В СВЕРДЛОВСКОЙ ОБЛАСТИ

GENETIC AND IMMUNOCHEMICAL STUDY OF *LEGIONELLA* STRAINS ISOLATED IN SVERDLOVSK REGION

ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, Оболensk, Московская область

State Scientific Center of Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow region, Russia

Исследованы 2 штамма возбудителя легионеллеза, выделенные во время вспышки в Свердловской области в 2007 г. от больного и из системы горячего водоснабжения. С помощью генетического анализа методами сиквенса генов, VNTR-типирования и ПЦР-исследования гена *omp 28* показано, что тестируемые штаммы относятся к патогенным легионеллам, но не принадлежат к одной генетической группе и эпидемическому кластеру. Проведенный иммунохимический анализ подтвердил, что оба выделенные штамма относятся к легионеллам серогруппы 1.

Two strains of *Legionella* isolated from patient and hot water supply system during outbreak in Sverdlovsk region in 2007 were studied. Using genetic analysis methods (genes sequencing, VNTR-typing and PCR-based study of *omp 28* gene), it was shown that tested strains are pathogenic but do not belong to one genetic group and epidemic cluster. Performed immunochemical analysis confirmed that both isolated strains belong to *Legionella* serogroup 1.

Журн. микробиол., 2008, № 2, С. 37—43

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2008, No. 2, P. 37—43

Ключевые слова: легионеллы, вспышка, генетический анализ, сиквенс, ПЦР, VNTR-анализ, моноклональные антитела, иммунохимический анализ

Key words: *Legionella*, outbreak, genetic analysis, sequence, PCR, VNTR-analysis, monoclonal antibodies, immunochemical analysis