

Способность к формированию моновидовых биопленок и совместному существованию с другими водными микроорганизмами, входящими в состав природных биопленок, наряду с молекулярно-генетическим типированием и определением вирулентности для лабораторных животных может быть дополнительной характеристикой штамма, определяющей его способность к формированию природных биопленок, представляющих существенную опасность при колонизации легионеллами водных систем. Скрининг большого числа изолятов легионелл, выделяемых в Российской Федерации по мере внедрения МУК 4.2.22-17-07, стандартизирующего выделение легионелл из объектов окружающей среды, позволит оценить практическое значение данного методического подхода.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ильина Т.С., Романова Ю.М., Гинцбург А.Л. Биопленки как способ существования бактерий в окружающей среде и организме хозяина: феномен, генетический контроль и системы регуляции их развития. *Генетика*. 2004, 40 (11): 1445 — 1456.
2. Atlas R.M. Legionella: from environmental habitats to disease pathology: detection and control. *Environ. Microbiol.* 1999, 1 (4): 283 — 293.
3. Karpova T., Dronina Yu., Temeznikova N. et al. Biofilm formation by Legionella spp. *In: Abstract book of 21st annual meeting of the EWGLI 2006*: p. 94 — 95.
4. Rogers J., Dowsett F.D., Dennis P.Y. Influence of plumbing material on biofilm formation and growth of Legionella pneumophila in a potable water systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 1994, 6: 1842 — 1851.
5. Rogers J., Dowsett A.B., Keevil C.W. A paint incorporating silver to control mixed biofilms containing Legionella pneumophila. *J. Ind. Microbiol.* 1995, 15 (4): 377 — 383.
6. Walker J.T., Bradshaw D.J., Bennett A.M. et al. Microbial biofilm formation and contamination of dental-unit water systems in general dental practice. *Appl. Environ. Microbiol.* 2000, 66 (8): 3363 — 3367.
7. Van der Kooij D., Veenendal H.R., Scheffer W. Biofilm formation and multiplication of Legionella in a model warm water system with pipes of cooper, stainless steel and cross-linked polyethylene. *Water. Res.* 2005, 39 (13): 2789 — 2798.

Поступила 10.10.07

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ЛЕГИОНЕЛЛЕЗА

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2008

*И.С.Тартаковский, А.Л.Гинцбург,
Г.Ф.Лазикова, Г.Г.Чистякова,
Ю.В.Демина, Т.И.Карпова,
Ю.Е.Дронина, И.В.Титова,
С.Б.Яцишина, Г.А.Шипулин,
В.В.Романенко, Е.П.Омон,
А.Л.Дурасова*

*I.S.Tartakovskii, A.L.Ginzburg,
G.F.Lazikova, G.G.Chistyakova,
Yu.V.Demina, T.I.Karpova,
Yu.E.Dronina, I.V.Titova,
S.B.Yatsyshina, G.A.Shipulin,
V.V.Romanenko, E.P.Omon,
A.L.Durasova*

СТАНДАРТЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ЛЕГИОНЕЛЛЕЗА И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ ВО ВРЕМЯ ЭПИДЕМИЧЕСКОЙ ВСПЫШКИ ПНЕВМОНИЙ В Г. ВЕРХНЯЯ ПЫШМА

НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф.Гамалеи, Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Центральный НИИ эпидемиологии, Москва; Центр гигиены и эпидемиологии в Свердловской области, Екатеринбург; Екатеринбургский диагностический центр

На примере расследования эпидемической вспышки пневмоний в г.Верхняя Пышма подтверждена высокая эффективность примене-

STANDARDS FOR LABORATORY DIAGNOSTICS OF LEGIONELLOSIS AND THEIR APPLICATION DURING EPIDEMIC OUTBREAK OF PNEUMONIA IN TOWN VERKHNYAYA PYSHMA

Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology; Federal Service for Surveillance for Protection of Consumers Rights and Human Welfare; Central Research Institute of Epidemiology, Moscow; Center of Hygiene and Epidemiology in Sverdlovsk region, Ekaterinburg; Ekaterinburg Center of Diagnostics, Russia

High effectiveness of application of international standards for legionellosis laboratory diagnostics was confirmed during investigation of pneumonia

ния международных стандартов лабораторной диагностики легионеллеза. Использование иммунохроматографического или иммуноферментного метода определения антигена легионелл в моче больных позволяет поставить окончательный диагноз легионеллезной инфекции в течение нескольких часов, своевременно начать этиотропную антибиотикотерапию и выявить возможные источники инфекции в потенциально опасных объектах внешней среды.

Журн. микробиол., 2008, № 2, С. 16—19

Ключевые слова: легионеллы, лабораторная диагностика, антиген легионелл, моча

outbreak in town Verkhnyaya Pyshma. Use of immunochromatographic method and enzyme immunoassay for detection of *Legionella* antigen in urine of patients allows to confirm diagnosis of *Legionella* infection during several hours, promptly begin etiologic antibacterial treatment and reveal possible sources of infection in potentially dangerous environmental objects.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2008, No. 2, P. 16—19

Key words: *Legionella*, laboratory diagnostics, *Legionella* antigen, urine

Легионеллы в качестве этиологического агента тяжелых пневмоний с высоким количеством летальных исходов известны уже более 30 лет. Спорадические случаи и эпидемические вспышки легионеллеза ежегодно выявляют в различных странах мира. Тем не менее, до недавнего времени легионеллез оставался труднодиагностируемой инфекцией. По данным Р. Edelstein даже в США, где первые штаммы легионелл (риккетсиоподобный штамм Tatlock) от больных были выделены еще в 1944 г., техникой бактериологического выделения легионелл из клинического материала владеют не более 50% микробиологических лабораторий [2, 7]. Качественные изменения произошли в 1999 г., когда ВОЗ, проанализировав опыт применения различных методов диагностики в странах с относительно высоким уровнем заболеваемости легионеллезом и при крупных эпидемических вспышках инфекции, подготовила стандарты лабораторной диагностики легионеллеза [8]. С 2002 г. эти же стандарты приняты в качестве диагностических критериев Европейской рабочей группой по легионеллезу [3]. В соответствии с упомянутыми стандартами диагноз легионеллеза в случае острой инфекции нижних дыхательных путей (клинически и рентгенологически подтвержденной) считается установленным при следующих условиях: 1. выделение легионелл из отделяемого респираторного тракта или легочной ткани; 2. 4-кратное и более нарастание титра специфических антител к *Legionella pneumophila* в реакции непрямой иммунофлюоресценции; 3. определение специфического растворимого антигена легионелл в моче иммуноферментным или иммунохроматографическим методом.

При отсутствии сыворотки крови, взя-

той в ранние сроки болезни, выявление достоверно высокого уровня антител к *L. pneumophila* (1:128 и выше) в одиночной сыворотке методом непрямой иммунофлюоресценции позволяет считать диагноз легионеллеза предположительно установленным. Аналогичным образом интерпретируются результаты, полученные на основании выявления возбудителя или его ДНК в респираторном секрете или легочной ткани с помощью прямой иммунофлюоресценции или ПЦР.

Стандарты лабораторной диагностики легионеллеза распространяются лишь на случаи заболеваний, вызванных штаммами *L. pneumophila* серогруппы 1. В то же время, более 80% спорадических и групповых случаев легионеллеза вызваны штаммами данной серогруппы, а при крупных внебольничных вспышках легионеллеза этиологическое значение штаммов 1 серогруппы показано в 98% случаев.

За менее чем 10-летний период стандартизации диагностики произошел качественный скачок в выявлении легионеллеза в мире. Так, ежегодно регистрируемое Европейской рабочей группой количество случаев легионеллеза выросло с 1160 случаев в 1994 г. до 4588 случаев в 2004 г. Причем, основной рост произошел, начиная с 2000 г., т.е. после введения упомянутых стандартов [4]. Резко возросло и число выявляемых ежегодно групповых случаев и эпидемических случаев инфекции (не менее 100 в год).

Основная роль в повышении эффективности диагностики легионеллеза принадлежит определению легионеллезного антигена в моче больных.

Еще в начале 80-х годов прошлого века было показано, что в самом начале болезни (2 — 3 сутки) антиген возбудителя можно обнаружить в моче больного легионел-

лезом, причем сам возбудитель в моче отсутствует. Антиген термостабилен и может быть выявлен в течение примерно 30 дней после начала заболевания. В 1989 г. метод был стандартизован компаниями Bifax (США) и Biotest (Германия), испытан 14 лабораториями европейских стран, включая лабораторию легионеллеза НИИЭМ им. Н.Ф.Гамалеи [5], и был рекомендован в качестве стандарта высокоспецифичного и чувствительного метода, позволяющего поставить окончательный диагноз на первой неделе заболевания.

Если непосредственно после введения стандарта метод определения антигена в моче использовали для постановки диагноза менее чем в 5% случаев, то в настоящее время метод применяют для постановки окончательного диагноза более чем в 90% подтвержденных случаев легионеллезной инфекции [1, 4]. Преимущество данного метода над традиционными, включенными в стандарт методами (бактериологическим и серологическим), состоит, прежде всего, в сроках исследований. Бактериологический метод занимает не менее 4 — 5 суток, причем требуются инвазивные процедуры по получению материала бронхоскопии, биопсии, так как из мокроты, особенно после начала этиотропной терапии, возбудитель удается выделить далеко не всегда. Выявление нарастания титров антител в реакции непрямой иммунофлюоресценции возможно лишь на 3 неделе заболевания, когда проведен курс антибиотикотерапии и исход заболевания обычно уже ясен. Необходимость исследования парных сывороток определяет ретроспективный характер диагностики легионеллеза данным методом.

Метод определения легионеллезного антигена в моче обычно применяется в 2 модификациях: иммуноферментный и иммунохроматографический тесты сопоставимы по чувствительности, специфичности, времени анализа и применяются в зависимости от задач исследования. Иммуноферментный метод позволяет количественно оценить наличие антигена и проверить одновременно более 80 образцов мочи, что важно при расследовании крупных эпидемических вспышек легионеллеза. В то же время, срок хранения тест-системы не превышает полугод. Иммунохроматографические разовые тесты в индивидуальной упаковке хранятся не менее 2 лет, не требуют дополнительного оборудования и используются для быстрой диагностики спо-

радических и групповых случаев легионеллезной инфекции.

Высокая эффективность стандартов лабораторной диагностики легионеллеза была продемонстрирована при расследовании эпидемической вспышки пневмоний в Верхней Пышме.

Предварительный диагноз легионеллеза был поставлен по результатам исследования сывороток крови 59 больных пневмонией с помощью иммуноферментной тест-системы для обнаружения иммуноглобулинов класса М к *L.pneumophila* серогруппы 1 (Vircell, Испания). Ранние IgM к *L.pneumophila* 1 были выявлены у 25 больных. Метод определения ранних IgM к возбудителю легионеллеза не входит в стандарты лабораторной диагностики инфекции, так как в первую неделю заболевания возможно как выявление М антител, так и полное их отсутствие, особенно у пациентов с выраженным иммунодефицитом, а также перекрестные реакции с некоторыми возбудителями респираторных инфекций [6]. Тем не менее, положительные результаты исследований данным методом у 42,4% обследованных позволили с высокой степенью вероятности предположить у них легионеллез.

При последующем применении стандартов лабораторной диагностики легионеллеза в качестве первого шага было выбрано применение иммунохроматографического метода для определения легионеллезного антигена в моче больных. Образцы мочи были взяты у группы наиболее тяжелых больных, находящихся в реанимационном отделении (8 человек). Исследования проводили с помощью 2 типов иммунохроматографических тест-систем (Bifax Now и SAS Legionella test, США). В течение 60 минут положительные результаты, продублированные обеими тест-системами, были получены для 5 больных. Еще у 2 заболевших при использовании тест-системы Bifax Now были получены положительные результаты, при использовании SAS Legionella test — сомнительные. У одного больного отрицательные результаты были получены при использовании обоих тест-систем.

Следующим шагом применения стандартов стало использование бактериологического метода для исследования секционного материала (легочная ткань) от 3 пациентов, умерших от пневмонии, и исследование 67 образцов мочи больных на наличие антигена с помощью количествен-

ного иммуноферментного метода (Biotest, Германия).

Применение иммуноферментного метода позволило в течение 3 часов количественно выявить легионеллезный антиген в 33 образцах мочи. Причем, в образцах мочи, исследованных ранее иммунохроматографическим методом, от 7 тяжелых больных легионеллезом, находившихся в реанимационном отделении, концентрация антигена была особенно велика, превосходя уровень рекомендованного положительного контроля в 8 — 10 раз.

Культура *L.pneumophila* серогруппы 1 была выделена из легочной ткани 1 из 3 умерших пациентов после 5 дней культивирования на буферно-угольно-дрожжевом агаре (BCYE) с селективной добавкой, содержащей цефамандол, полимиксин и анизомицин (модификация данной среды называется также ВМРА) [6]. Последующая идентификация культуры с помощью бактериологического метода, латекс-агглютинации, иммунофлюоресценции и ПЦР заняла 2 суток.

Параллельно секционный материал также был исследован с помощью количественной модификации ПЦР с видоспецифическими праймерами на *mp* ген *L.pneumophila*. ДНК возбудителя в высокой концентрации была выявлена в образцах легочной ткани пациентов, умерших от легионеллезной пневмонии.

Применение различных методов лабораторной диагностики легионеллеза при расследовании эпидемической вспышки пневмоний в г.Верхняя Пышма подтвердило ключевую роль и высокую эффективность метода определения антигена легионеллы в моче больных. Возможность получения достоверного результата, позволяющего поставить окончательный диагноз легионеллезной инфекции в течение 1 — 3 часов, открывает принципиально новые возможности для быстрой коррективной антибиотикотерапии больных с помощью макролидов, организации эффективного эпидемиологического расследования и профилактических мероприятий. Выделение культуры из клинического материала остается «золотым стандартом» диагностики, но требует не менее 6 — 7 дней. Кроме

того, возможности этого метода как и ПЦР ограничены необходимостью инвазивных процедур, связанных с получением материала бронхоскопии и биопсии. При исследовании секционного материала от пациентов из Верхней Пышмы данные ограничения отсутствовали, но специальные требования к взятию и транспортировке материала на легионеллез могли оказать влияние на результаты бактериологических исследований. Культура выделена лишь из материала от 1 из 3 пациентов. Метод определения IgM в сыворотке крови также как и различные модификации ПЦР не входят в стандарты лабораторной диагностики, но их применение сыграло положительную роль для постановки предполагаемого диагноза или в качестве дополнительного подтверждающего теста.

Внедрение стандартов лабораторной диагностики легионеллеза в Российской Федерации с особым акцентом на выявление антигена легионеллы в моче больных в первые дни заболевания позволит быстро и достоверно выявлять спорадические случаи и эпидемические вспышки легионеллезной этиологии, обеспечит своевременное и эффективное лечение больных и проведение противоэпидемических мероприятий.

ЛИТЕРАТУРА

1. Тартаковский И.С., Темужникова Н.Д., Карпова Т.И. Легионеллез: проблемы и перспективы лабораторной диагностики. Пробл. особо опасных инфекций. 2005, 2: 17 — 23.
2. Edelstein P.H. Antimicrobial therapy for legionnaires disease: time for a change. Ann. Intern. Med. 1998, 129: 328 — 329.
3. European guidelines for control and prevention of travel associated legionnaires disease, 2002.
4. Legionella and the prevention of legionellosis. WHO, 2006.
5. Harrison T., Uldum S., Alexieu-Daniel S. et al. Multicenter evaluation of the biotest legionella urinary antigen test. Clin. Microbiol. Infect. 1998, 4: 359 — 365.
6. Harrison T., Taylor A. A laboratory manual for Legionella. John Wiley & Sons Ltd, 1988.
7. Legionella. R. Marre (ed.). Washington, ASM Press, 2002.
8. WHO recommended surveillance standards, 1999.

Поступила 10.10.07