

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2008

*Б.И.Никонов, В.В.Романенко,
Ю.В.Жукова, А.Л.Дурасова,
Т.С.Астахова, С.Б.Гаранина*

ПЦР-ДИАГНОСТИКА ПРИ РАССЛЕДОВАНИИ ВСПЫШКИ ЛЕГИОНЕЛЛЕЗА

Управление Роспотребнадзора по Свердловской области, Центр гигиены и эпидемиологии в Свердловской области, Екатеринбург; Центральный НИИ эпидемиологии, Москва

Представлены результаты исследований биологического материала от больных с диагнозом «внебольничная пневмония» и материала из внешней среды в период вспышки легионеллеза в г. Верхняя Пышма Свердловской области в июле—августе 2007 г., проведенные с помощью ПЦР-анализа.

Журн. микробиол., 2008, № 2, С. 44—46

Ключевые слова: пневмонии, ПЦР-анализ, ДНК *Legionella pneumophila*

С апреля 2002 г. в Свердловской области введена персонифицированная регистрация случаев заболеваемости пневмонией. В июле — августе 2007 г. в г. Верхняя Пышма Свердловской области было отмечено резкое повышение заболеваемости пневмониями. За медицинской помощью в стационар обратились 202 человека (184 взрослых, 18 детей), из них были госпитализированы 197 человек, 13 больным были проведены реанимационные мероприятия, умерли 5 человек. Болели преимущественно мужчины пожилого и среднего возраста. В числе прочих возбудителей пневмонии как один из возможных этиологических агентов заболевания рассматривались *Legionella pneumophila*. В силу биологических особенностей *L. pneumophila* культивирование этих бактерий требует наличия питательных сред высокого качества, а зачастую выделение чистой культуры возбудителя крайне затруднено. Кроме того, бактериологическое исследование материала на легионеллез осуществляется в течение длительного времени. С целью экспресс-диагностики был использован метод ПЦР.

Цель работы заключается в уточнении этиологического диагноза; установлении источника, путей и факторов передачи инфекции; изучении возможности применения метода ПЦР при исследовании биологического материала от людей и с объек-

*B.I.Nikonov, V.V.Romanenko,
Yu.V.Zhukova, A.L.Durasova,
T.S.Astakhova, S.B.Garanina*

PCR-DIAGNOSTICS IN INVESTIGATION OF LEGIONNAIRES' DISEASE OUTBREAK

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

Results of studies of biological samples from patients with community-acquired pneumonia and samples from environment during Legionnaires' disease outbreak in town Verkhnyaya Pyshma (Sverdlovsk region) in July—August 2007 performed by PCR analysis are presented.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2008, No. 2, P. 44—46

Key words: pneumonia, PCR analysis, *Legionella pneumophila* DNA

тов окружающей среды на инфицирование *L. pneumophila*.

Исследование проводилось на базе лаборатории контроля биологических факторов Центра гигиены и эпидемиологии в Свердловской области. В качестве объектов исследования на наличие ДНК *L. pneumophila* были использованы: биологический материал от людей (ротоглоточные смывы, плазма крови, сыворотка крови, моча, мокрота, бронхоальвеолярный лаваж); секционный материал; вода из водопроводных сетей и водных объектов г. Верхняя Пышма; смывы с душевых насадок, внутренних поверхностей труб горячего водоснабжения; смывы с медицинского оборудования (небулайзеров) реанимационного отделения ЦГБ г. Верхняя Пышма, где проходили лечение больные легионеллезом; культуральные смывы с посевов воды на питательные среды для выявления *L. pneumophila*.

Посев материала производился на легионелл-агар производства HIMEDIA, Индия. Забор, транспортировка и предобработка проб материала от людей и секционного материала проводились в соответствии с МР «Забор, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики» (М., 2003). Для анализа использовали 50 мкл ротоглоточного смыва, мочи, мокроты, бронхоальвеолярного лаважа и суспензии секционного материала,

плазму и сыворотку крови исследовали в объеме 100 мкл. Забор проб воды осуществлялся в две стерильные емкости по 500 мл в соответствии с ГОСТ Р 51592-2000 «Вода. Общие требования к отбору проб», ГОСТ Р 51593-2000 «Вода питьевая. Отбор проб», МУК 4.2.1884-04 «Санитарно-микробиологический и санитарно-паразитологический анализ воды поверхностных водных объектов», МУК 4.2.1018-01 «Методические указания по санитарно-микробиологическому анализу питьевой воды». В дальнейшем каждая проба воды (500 мл) концентрировалась методом фильтрования с использованием стерильных мембранных фильтров «Владипор» типа МФАС-ОС-2 (диаметр фильтра 47 мм, диаметр пор 0,45 мкм) на приборе вакуумной фильтрации воды «Sartorius». Фильтры измельчали, помещали в одноразовые пластиковые пробирки типа «Эппендорф» на 1,5 мл, добавляли 1000 мкл стерильной деионизированной воды и оставляли в штативе на 5 мин, периодически (3 — 4 раза) встряхивая на вортексе. Центрифугировали пробы 5 сек при 5000 об/мин. Для анализа отбирали 50 мкл. Забор смывов производился стерильными ватными тампонами в пробирки с 3 мл стерильного физраствора. Пробирки встряхивали в течение 10 мин. Для анализа отбирали 50 мкл смывной жидкости.

Выделение ДНК проводили с помощью комплекта реагентов «ДНК-сорб-В» производства ФГУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора.

Для проведения ПЦР использовали тест-систему «АмплиСенс® Legionella pneumophila-FRT» с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени (ЦНИИ эпидемиологии). Исследования проводили на приборе RotorGene-3000 («Corbet Research», Австралия).

В результате исследований 136 ротоглоточных смывов от больных, обратившихся в стационар за медицинской помощью, только в одной пробе была выявлена ДНК *L.pneumophila* (больной Ш., 2 г). При исследовании 78 образцов плазмы крови и 2 сывороток крови не было получено ни одного положительного результата. Поступившие для исследования методом ПЦР 8 проб мочи также не содержали ДНК *L.pneumophila*. Из 2 проб мокроты в 1 обнаружена ДНК *L.pneumophila* (больная О., 18 лет, состояние средней тяжести, в моче, сыворотке крови, ротоглоточном смыве ДНК *L.pneumophila* отсутствует). Из 2 проб

бронхоальвеолярного лаважа в одной пробе обнаружена ДНК *L.pneumophila* (больной М., 58 лет, состояние тяжелое, в дальнейшем умер, в моче ДНК *L.pneumophila* не обнаружена). Незначительное количество исследованных проб мокроты обусловлено тем, что в клинической картине заболевания преобладал непродуктивный кашель с отсутствием отделяемого.

Был исследован секционный материал от двух человек. От больной Б. (83 г., диагноз: пневмония), умершей в больнице г. Верхняя Пышма, на анализ поступили 3 пробы: легкое, трахея, селезенка. Во всех трех пробах обнаружена ДНК *L.pneumophila*. От больного П. (49 лет, диагноз: пневмония), проживавшего в г. Верхняя Пышма, умершего в одной из больниц Екатеринбурга, поступили 3 пробы (участки легких). При вскрытии у него была обнаружена патологоанатомическая картина легких, сходная с таковой при «болезни легионеров». При проведении ПЦР-анализа ДНК *L.pneumophila* не обнаружена.

При проведении эпидрасследования было исследовано 89 проб воды, в том числе: вода из фонтана — 2 пробы, результат отрицательный; холодная вода — 16 проб, результат отрицательный; горячая вода из разводящей сети и на технологических стадиях водоподготовки — 52 пробы, из них в 19 пробах обнаружена ДНК *L.pneumophila*, что составляет 36,5%; вода открытых водоемов — 4 пробы, результат отрицательный; техническая вода — 15 проб, из них в 12 пробах обнаружена ДНК *L.pneumophila*, что составляет 80%.

С объектов окружающей среды было исследовано 35 смывов. Из них 5 смывов с медицинского оборудования (небулайзеры) в больнице, где проходили лечение больные легионеллезом, все они дали отрицательный результат на наличие ДНК *L.pneumophila*; 27 смывов с душевых насадок в квартирах заболевших — в 3 обнаружена ДНК *L.pneumophila*; 1 смыв с внутренней поверхности шланга в душевой и 2 смыва с внутренней поверхности трубы горячего водоснабжения тепlopункта — результат отрицательный. Из 68 культуральных смывов в 5 пробах выделена ДНК *L.pneumophila* (1 — техническая вода из градирни, 4 — горячая вода). Следует отметить, что 3 из 5 положительных при идентификации проб были направлены на бактериологическое исследование после положительных в ПЦР результатов исследования исходного материала. Это под-

тверждает наличие в вышеуказанных пробах воды жизнеспособных клеток *L.pneumophila*. В то же время, 5 проб, положительных в ПЦР, культурально не подтвердились. Чистую культуру *L.pneumophila* бактериологически выделить не удалось.

Как показал опыт применения ПЦР-анализа при расшифровке вспышки легионеллеза в г.Верхняя Пышма Свердловской области, он является высоко эффективным при исследовании секционного материала, а также материала из нижних дыхательных путей (мокрота, бронхоальвеолярный лаваж). Исследование сыворотки и плазмы крови, мазков из ротоглотки и мочи является низкоинформативным и нецелесообразным. ПЦР-анализ незаменим как экспресс-метод при постановке диагноза легионеллезной пневмонии, но должен применяться в комплексе с другими методами: бактериологическим, иммунохроматографическим, иммуносерологическим. Преимущества метода ПЦР (быстрота получения результата и высокая чувствительность) позволяют использовать его для скрининговых исследований объектов окружающей среды. Обнаружение ДНК *L.pneumophila* в воде системы централизо-

ванного горячего водоснабжения и в смывах с душевых насадок в квартирах заболевших легионеллезом позволило заподозрить, а в дальнейшем и доказать ее роль в возникновении вспышки легионеллеза. Как показали данные эпидемиологического расследования, все заболевшие проживали в домах, обеспеченных централизованным горячим водоснабжением. Несмотря на то, что процент находок ДНК *L.pneumophila* в технической воде достаточно высок, ее роль в эпидпроцессе не установлена.

Однако ПЦР-анализ имеет и свои недостатки при обследовании объектов окружающей среды из-за невозможности определения жизнеспособности бактериальных клеток, чей генетический материал обнаружен в пробах. Таким образом, определение эпидемиологического значения исследуемого объекта требует обязательного подтверждения положительных в ПЦР результатов культуральным методом. В то же время, ПЦР-анализ является надежным и достоверным методом при идентификации *L.pneumophila* в смеси бактериальных культур.

Поступила 10.10.07

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2008

*Г.Л.Карбышев, А.Н.Терентьев,
Л.М.Веркина, И.Р.Симонова,
А.П.Кочеткова, А.Н.Наркевич,
Л.К.Лысова, Л.В.Ларионова*

СЕРОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ЛЕГИОНЕЛЛЕЗА

Научно-исследовательский противочумный институт, Ростов-на-Дону

В работе представлены методические подходы к конструированию препаратов для серологической диагностики легионеллеза, созданы антигенный и иммуноглобулиновый диагностические наборы с известными свойствами. Изучены иммуногенные свойства белковых и липополисахаридных антигенов, имеющих диагностическое значение, показана общность белковых антигенов *Legionella pneumophila* семи серогрупп. Получен растворимый антиген с известным составом и использован для создания антигенного легионеллезного полимерного диагностикума; получены гипериммунные сыворотки, на основе которых созданы иммуноглобулиновый полимерный диагностикум и набор коаггулинирующих диагностикумов семи серогрупп. Антигенный полимерный диагностикум рекомендован к регистрации.

Журн.микробиол., 2008, № 2, С. 46—50

*G.L.Karbyshv, A.N.Terentyev,
L.M.Verkina, I.R.Simonova,
A.P.Kochetkova, A.N.Narkevich,
L.K.Lysova, L.V.Larionova*

SEROLOGIC DIAGNOSTICS OF LEGIONELLA INFECTION

Research Institute for Plague Control, Rostov-on-Don, Russia

Technical approaches to construction of preparations for serologic diagnostics of *Legionella* infection were presented in the article; antigenic and immunoglobulin-based diagnostic kits with known characteristics were developed. Immunogenic properties of protein and lipopolysaccharide antigens, which have diagnostic value, were studied; similarity of protein antigens from 7 serogroups of *L.pneumophila* was demonstrated. Soluble antigen with known composition was obtained and used for the development of antigen-based polymeric kit for diagnostics of *Legionella* infection. On the basis of hyperimmune sera, immunoglobulin-based polymeric diagnostic kit and array of coagglutinating diagnostic kits for the mentioned 7 serogroups were developed. Antigen-based polymeric diagnostic kit was recommended for licensure.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2008, No. 2, P. 46—50