

УДК [616.24-002-02:579.8]-078

Применение стандартов лабораторной диагностики легионеллеза во время эпидемической вспышки пневмоний в городе Верхняя Пышма Свердловской области

И.С. Тартаковский¹, А.Л. Гинцбург¹, Д.О. Михайлова⁴, З. Д. Бобылева⁴,
В.В. Романенко³, Т.И. Карпова¹, Ю.С. Аляпкина¹, Е.П. Омон⁴, Ю.М. Романова¹,
О.Л. Воронина^{1,5}, В.Г. Лунин¹, С.Б. Яцишина², Г.А. Шипулин², Ю.Е. Дронина¹

¹ ГУ НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи РАМН, Москва, Россия

² ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия

³ ФГУ Центр гигиены и эпидемиологии в Свердловской области, Екатеринбург, Россия

⁴ Министерство здравоохранения Свердловской области, Екатеринбург, Россия

⁵ Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Москва, Россия

За последние годы достигнут качественный прогресс в диагностике и профилактике легионеллеза, основанный на внедрении в практику современных стандартов лабораторной диагностики и количественном мониторинге возбудителя в потенциально опасных объектах окружающей среды. Применение международных стандартов лабораторной диагностики во время эпидемической вспышки пневмоний в городе Верхняя Пышма Свердловской области позволило в сжатые сроки установить этиологический диагноз. Особое значение имело применение иммунохроматографического метода для выявления антигена легионелл в моче, входящего в стандарты диагностики ВОЗ, что позволило подтвердить диагноз для больных, находившихся в реанимационном отделении, в течение 30 минут. Анализ потенциально опасных объектов окружающей среды в Верхней Пышме с

помощью бактериологических методов и ПЦР в реальном времени позволил установить достаточно широкое распространение *Legionella* spp. в водных образцах из различных источников, преимущественно в некультивируемом состоянии. Эпидемически значимые изоляты *Legionella pneumophila* выделяли значительно реже и предварительный скрининг образцов с помощью ПЦР в реальном времени хорошо коррелировал с результатами культурального исследования. Применение современных стандартов молекулярного типирования легионелл, разработанных Европейской рабочей группой по легионеллезу, позволило охарактеризовать аллельный профиль выделенных штаммов.

Ключевые слова: легионеллез, лабораторная диагностика, профилактика, мониторинг, ПЦР в реальном времени, окружающая среда, молекулярное типирование.

Контактный адрес:

Игорь Семенович Тартаковский

123098, Москва, Россия

ул. Гамалеи 18

НИИ эпидемиологии и микробиологии

им. Н.Ф. Гамалеи РАМН

Use of Laboratory Standards for Diagnosis of Legionellosis during the Outbreak of Pneumonia in Verhnyaya Pyshma (Sverdlovsk Region)

I.S. Tartakovskiy¹, A.L. Gintzburg¹, D.O. Mikhailova⁴, Z.D. Bobyleva⁴, V.V. Romanenko³, T.I. Karpova¹, Yu.S. Alyapkina¹, E.P. Omon⁴, Yu.M. Romanova¹, O.L. Voronina^{1,5}, V.G. Lunin¹, S.B. Yatzishina², G.A. Shipulin², Yu.E. Dronina¹

¹ Research Institute of Epidemiology and Microbiology named under N.F. Gamaleya, Moscow, Russia

² Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia

³ Sverdlovsk Regional Center for Hygiene and Epidemiology, Ekaterinburg, Russia

⁴ Ministry of Health of Sverdlovsk region, Ekaterinburg, Russia

⁵ Institute of Biochemistry named under A.N. Bach, Moscow, Russia

Over the last years there was a significant improvement in diagnostics and prophylaxis of legionellosis that is due to introduction of current standards of laboratory diagnosis and quantitative analysis of the pathogen in the environmental objects. Use of international laboratory standards during the outbreak of pneumonia in Verhnyaya Pyshma (Sverdlovsk region) made it possible to determine etiology in timely manner. Because of the use of immunochromatography (one of the WHO standard methods) for detecting legionellae antigen in urine, ICU patients had their diagnosis confirmed in 30 min. Analysis of the environmental objects in Verhnyaya

Pyshma using culture and real-time PCR demonstrated the wide distribution of Legionella spp. in water samples from the different sources. Epidemic *Legionella pneumophila* strains were isolated less frequently, and preliminary screening using real-time PCR showed a good correlation with the culture results. Allele profile of isolates was characterized by the molecular typing according to the modern standards (developed by European Working Group on Legionellosis).

Key words: legionellosis, laboratory diagnosis, prophylaxis, surveillance, real-time PCR, environment, molecular typing.

Введение

Несмотря на то, что легионеллезная инфекция известна уже более 30 лет, достаточно хорошо изучены различные аспекты биологии и экологии возбудителя, разработаны методы диагностики и лечения, тем не менее легионеллез часто по традиции продолжают относить к категории недавно открытых и малоизученных инфекций. Во многом эта ситуация объясняется тем, что до недавнего времени легионеллез оставался труднодиагностируемой инфекцией. Даже в США, стране «первооткрывательнице» легионелл в конце 90-х годов прошлого века, техникой бактериологического выделения легионелл из клинического материала владели сотрудники не более 50% клинических микробиологических лабораторий [1].

Качественные изменения произошли в 1999 г., когда Всемирная Организация Здравоохранения (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 [2]. 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 выделении легионелл из отделяемого респираторного тракта или легочной ткани;
- при 4-кратном или более нарастании титра специфических антител к *Legionella pneumophila* в реакции непрямой иммунофлюоресценции;
- при определении специфического растворимого антигена легионелл в моче иммуноферментным или иммунохроматографическим методом.

При отсутствии сыворотки крови, взятой 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 полимеразной цепной реакции (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 штам-

мами данной серогруппы, а при крупных внебольничных вспышках легионеллеза этиологическое значение штаммов 1-й 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 в 1994 г. до 4588 в 2004 г. Причем основной рост произошел, начиная с 2000 г., т. е. после введения вышеупомянутых стандартов [4]. Резко возросло и число выявляемых ежегодно групповых случаев и эпидемических вспышек инфекции – не менее 100 в год. Наиболее крупные и значимые из них представлены в табл. 1.

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

Еще в начале 80-х годов прошлого века было показано, что в самом начале болезни (2–3-е сутки) антиген возбудителя можно обнаружить в моче больного легионеллезом, 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 Binaх (США) и Biotest (Германия), испытан 14 лабораториями Европейских стран (включая лабораторию легионеллеза ГУ НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи РАМН) [5] и был рекомендован в качестве высокоспецифичного и чувствительного метода, позволяющего поставить окончательный диагноз на первой неделе заболевания.

Если непосредственно после введения стандарта определения антигена *L. pneumophila* в моче данный метод использовали для диагностики менее чем в 5% случаев, то в настоящее время метод применяют для постановки окончательного диагноза более чем в 90% подтвержденных случаев легионеллезной инфекции [4, 6]. Превосходство данного метода над традиционными, включенными в стандарт бактериологическим и серологическим методами состоит, прежде всего, в сроках исследования. Бактериологический метод занимает не менее 4–5 суток, причем требуются инвазивные процедуры для получения материала (бронхоскопия, биопсия), так как из мокроты, особенно после начала этиотропной терапии, возбудитель удаётся выделить далеко не всегда. Выявление диагностического нарастания титров антител в реакции непрямой иммунофлюоресценции возможно лишь на третьей 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 двух модификациях: иммуоферментный и иммунохроматографический тест. Они сопоставимы по чувствительности, специфичности, времени анализа и применяются в зависимости от задач исследования. Иммуоферментный 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 6 мес. Иммунохроматографические разовые тесты в индивидуальной упаковке хранятся не менее 2 лет, не требуют дополнительного оборудования и используются для быстрой диагностики спорадических и групповых случаев легионеллезной инфекции.

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

Материал и методы исследования

Материал от больных пневмонией (сыворотка крови, моча, аутопсийный материал легочной ткани) был собран в городской больнице (Верхняя Пышма) и доставлен для исследования в специализированные лаборатории Екатеринбург и Москвы. Определение ранних IgM-антител к *L. pneumophila* серогруппы 1 проводили в Екатеринбургском диагностическом центре с помощью тест-системы Vircell (Испания). Мочу больных на присутствие растворимого антигена *L. pneumophila* серогруппы 1 исследовали с помощью 2 иммунохроматографических тест-систем – Binaх и SAS (США) и иммуоферментной тест-системы Biotest (Германия) в НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи. Аутопсийный материал легочной ткани исследовали с помощью количественной модификации ПЦР с видоспецифическими праймерами на *mip*-ген *L. pneumophila* в ЦНИИ эпидемиологии. Выделение культуры легионелл из клинического материала и ее последующую идентификацию проводили в НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи на среде ВМРА (Oxoid, Великобритания).

Образцы окружающей среды (вода и смывы биопленок) в Верхней Пышме были отобраны сотрудниками Центра гигиены в Свердловской области и исследовались в НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи в соответствии с «Методическими указаниями по выяв-

Таблица 1. Наиболее значимые эпидемические вспышки легионеллеза в последние годы

Год	Страна	Количество заболевших (умерших)
1999	Голландия	242 (25)
1999	Бельгия	93 (5)
2000	Австралия	98 (8)
2001	Норвегия	28 (9)
2002	Испания	470 (9)
2002	Англия	179 (7)
2003	Морской круиз «Ocean Monarch»	9 (2)
2003-2004	Франция	86 (17)
2004	Швеция	32 (3)
2005	Норвегия	55 (10)
2006	Испания	122 (6)
2007	Россия, Верхняя Пышма	190 (5)

лению бактерий *Legionella pneumophila* в объектах окружающей среды» [7]. Для количественного определения ДНК легионелл в объектах окружающей среды с помощью ПЦР в реальном времени были выбраны следующие праймеры и флуоресцентные зонды: для выявления *Legionella* spp. – из последовательности гена, кодирующего 16S рРНК, для выявления *L. pneumophila* – из последовательности гена *tip*. Выбранные флуоресцентные зонды были линейными по типу TaqMan и содержали различные флуорофоры на 5'-конце и соответствующие им гасители на 3'-конце. Молекулярно-генетическое типирование выделенных штаммов легионелл осуществляли в НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи в соответствии с STB протоколом Европейской рабочей группы по легионеллезу [8].

Результаты исследования

В середине июля 2007 г. в Верхней Пышме Свердловской области была выявлена эпидемическая вспышка легионеллезной инфекции, которая продолжалась около 3 недель. За период вспышки за медицинской помощью обратились более 200 человек с подозрением на легионеллезную пневмонию. Окончательный диагноз установлен 190 больным, этиологический диагноз подтвержден для 74 пациентов, в 5 случаях имел место летальный исход [9]. Большая часть случаев заболеваний приходилась на период с 15 по 25 июля. Бактериологические и вирусологические исследования, проводившиеся специалистами Минздравсоцразвития и Роспотребнадзора Свердловской области, позволили к 25 июля исключить из числа возможных

этиологических агентов все потенциальные возбудители респираторных инфекций и пневмоний, за исключением легионелл. В пользу легионеллезной этиологии вспышки свидетельствовали и предварительные результаты эпидемиологического расследования, показавшие, что начало вспышки, с учетом инкубационного периода заболевания, составлявшего от 2 до 10 дней, коррелирует с запуском воды в систему горячего водоснабжения города после нескольких недель ремонтно-профилактических работ (ремонт СуГРЭС, опрессовки).

Предварительный диагноз легионеллеза был поставлен 27 июля 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-антитела к *L. pneumophila* серогруппы 1 были выявлены у 25 больных. Метод определения ранних IgM-антител к возбудителю легионеллеза не входит в стандарты лабораторной диагностики инфекции, так как в первую неделю заболевания возможны как выявление IgM-антител, так и полное их отсутствие, особенно у пациентов с выраженным иммунодефицитом, а также перекрестные реакции с некоторыми возбудителями респираторных инфекций [10]. 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, находившихся в реанимационном отделении (8 человек). Исследование на выявление легионеллезного антигена в моче каждого больного было проведено 29 июля с помощью двух типов иммунохроматографических тест-систем: Binaх Now и SAS Legionella test (США). В течение 30 мин положительные результаты, продублированные обеими тест-системами, были получены для 5 больных. Еще у двух пациентов при использовании тест-системы Binaх Now были получены положительные результаты, но при применении SAS Legionella test результаты были сомнительными. У одного больного отрицательные результаты были получены при использовании обеих тест-систем. Параллельно 29 июля секционный материал от 2 умерших больных был исследован с помощью количественной модификации ПЦР с видоспецифическими праймерами на *tip* ген *L. pneumophila*. ДНК возбудителя

Таблица 2. Методы лабораторной диагностики, применявшиеся для установления диагноза легионеллезной инфекции во время эпидемической вспышки пневмоний в Верхней Пышме 27-29 июля 2007 г.

Метод	Исследуемый материал	Обследуемый контингент больных	Количество образцов	Позитивные образцы (%)	Время, затраченное на исследование	Место проведения исследования
Определение антигена иммунохроматографическим методом *	Моча	Пациенты реанимации	8	7 (88%)	30 мин	НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи (Москва)
Выделение культуры легионелл*	Секционный материал (легочная ткань)	Умершие	2	1 (50%)	5 сут	НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи (Москва)
ПЦР	Секционный материал (легочная ткань)	Умершие	2	2 (100%)	4 ч	ЦНИИ эпидемиологии (Москва)
Определение IgM антител	Сыворотка крови	Все госпитализированные с диагнозом пневмония	59	25 (42,4%)	4 ч	Клинико-диагностический центр (Екатеринбург)

Примечание:* – метод входит в стандарт диагностики легионеллеза и рекомендован ВОЗ для постановки окончательного диагноза легионеллезной инфекции.

в высокой концентрации была выявлена в образцах легочной ткани пациентов, умерших от легионеллезной пневмонии.

Поскольку иммунохроматографический метод определения антигена в моче рекомендован ВОЗ и Европейской рабочей группой по легионеллезу для окончательного подтверждения диагноза легионеллезной инфекции и положительные результаты, полученные данным методом, были дополнены с помощью ПЦР материала аутопсии, то 29 июля 2007 г. можно считать датой окончательного подтверждения легионеллезной этиологии вспышки инфекции (табл. 2).

Следующим шагом применения стандартов стало использование бактериологического метода для исследования секционного материала (легочная ткань) от трех пациентов, умерших от пневмонии, и исследование 67 образцов мочи на наличие антигена с помощью количественного иммуноферментного метода (Biotest, Германия), взятых у больных 30 июля.

Применение иммуноферментного метода позволило в течение 4 ч 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 буферном угольно-дрожжевом агаре (BCYE) с селективной добавкой, содержащей цефамандол, полимиксин и анизомицин (модификация данной среды называется также ВМРА) [10]. Последующая идентификация культуры с помощью бактериологических тестов, латекс-агглютинации, иммунофлюоресценции и ПЦР заняла 2 суток.

Помимо сбора клинического материала 30 июля были взяты на исследование образцы воды и смывы биопленок в местах наиболее вероятного присутствия легионелл в системе водоснабжения Верхней Пышмы и прилегающих окрестностей. Образцы исследовали бактериологически и с помощью ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) в соответствии с «Методическими указаниями по выявлению бактерий *Legionella pneumophila* в объектах окружающей среды». Результаты ПЦР в реальном времени свидетельствуют о широком распространении *Legionella* spp. в природных и хозяйственных водных системах Верхней Пышмы. Вместе с тем, выделение культур *Legionella* spp. лишь из одного образца воды подтверждает низкую концентрацию непатогенных видов легионелл, находящихся в воде преимущественно в некультивируемом состоянии. Присутствие *L. pneumophila* выявляли значительно реже, но в данном случае корреляция ПЦР и результатов бактериологических исследований была более выражена (табл. 3). В течение первой недели исследований культура *L. pneumophila* серогруппы 1 была выделена из биопленки с поверхности дренажного канала теплоузелка 1.

Таблица 3. Результаты исследования образцов окружающей среды в Верхней Пышме с помощью ПЦР-РВ на наличие *Legionella* spp. и *Legionella pneumophila* (образцы воды и смывы биопленок взяты 30.07.2007 г.)

Описание образца	Результаты оценки методом ПЦР-РВ		Выделенная культура
	<i>Legionella</i> spp.	<i>Legionella pneumophila</i>	
Пробы воды от 30.07.07			
Дренажная вода тепловыпускника 1	+	-	<i>L. pneumophila</i> серогруппа 1**
Обводной трубопровод в тепловыпускнике 2	+	-	
Дренажный колодец, промывная вода после фильтра, СУГРЭС	+	-	
Сбросный канал теплой воды	+	-	
Вода из трубы подающего трубопровода тепловыпускника 1	-	-	
Вода из колодца 1	+	-	<i>Legionella</i> spp.*,**
Вода из колодца 2	+	-	
Вода из фонтана № 1	+	-	
Вода из фонтана № 2	+	-	
Вода техническая промышленного предприятия	+	+	<i>L. pneumophila</i> серогруппа 3**
Смывы биопленок от 30.07.07			
Смыв с поверхности дренажного канала тепловыпускника 1	+	+	<i>L. pneumophila</i> серогруппа 1
Смыв из дренажной трубы из тепловыпускника 2	-	-	
Смыв из дренажного колодца, СУГРЭС	+	-	
Смыв из дренажного колодца над кромкой воды, СУГРЭС	-	-	
Внутренняя поверхность трубы подающего трубопровода тепловыпускника 1	-	-	
Смыв с сетки дренажного канала тепловыпускника 1	+	-	
Смыв с душевой сетки в квартире больного 1	-	-	
Смыв с душевой сетки в квартире больного 2	+	+	<i>L. pneumophila</i> серогруппа 3**

Примечание: * – изоляты выделены в сентябре-октябре 2007 г. при повторном исследовании концентратов образцов, хранившихся при 4°C с использованием обработки кислотным буфером;
** – изоляты *Legionella* spp.

При повторном исследовании в сентябре-октябре 2007 г. образцов воды и биопленок, хранившихся при 4°C в концентрированном виде, с измененным режимом кислотной обработки, были выделены еще несколько культур *L. pneumophila* (см. табл. 3, табл. 4). Изолят *L. pneumophila* серогруппы 1 был выделен из воды дренажного канала тепловыпускника 1. Еще 2 культуры *L. pneumophila* серогруппы 3 были выделены, соответственно, из смыва с душевой сетки в квартире больного легионеллезом и из технической воды промышленного предприятия. Три изолята *Legionella* spp. были выделены из одного из технических колодцев системы канализации Верхней Пышмы.

Для 5 штаммов *L. pneumophila*, выделенных в районе вспышки легионеллеза, был определен аллельный профиль по протоколу STB EWGLI.

В качестве референтного использовали штамм *L. pneumophila* Philadelphia-1 (ATCC 33152).

Результаты молекулярного типирования представлены в табл. 5, где отражены номера известных последовательностей базы данных EWGLI, которым в 100% соответствует нуклеотидная последовательность фрагментов генов выделенных штаммов. Из табл. 5 видно, что все 5 штаммов уникальны и отличаются между собой по последовательностям секвенированных фрагментов ДНК. По мишени *asd* идентичны штаммы Pyshma-2 и Pyshma-5, наибольшие отличия наблюдаются между штаммами Pyshma-3 и Pyshma-4. По мишени *flaA* идентичны Pyshma-2 и Pyshma-4. Наименьшее сходство имеют референтный штамм и Pyshma-3. По фрагменту *pilE* сходны 3 штамма: Pyshma-1, Pyshma-2 и Pyshma-3, а штамм Pyshma-5 идентичен референт-

Таблица 4. Изоляты *L. pneumophila* и *Legionella* spp., выделенные при расследовании эпидемической вспышки легионеллеза в Верхней Пышме

Изолят	Серогруппа <i>L. pneumophila</i>	Исследуемый материал	Срок выделения, сутки
Pyshma 1	1	Легочная ткань (секционный материал)	5
Pyshma 2	1	Смыв биопленки с поверхности дренажного канала теплопункта	8
Pyshma 3	3	Смыв с поверхности сетки душа в квартире заболевшего легионеллезом*	6
Pyshma 4	1	Дренажная вода*	7
Pyshma 5	3	Техническая вода*	7
Pyshma 6**			6
Pyshma 7**		Вода из колодца 1 системы городского водоснабжения*	6
Pyshma 8**			8

Примечание: * - изоляты выделены в сентябре-октябре 2007 г. при повторном исследовании концентратов образцов, хранившихся при 4 °С с использованием обработки кислотным буфером.

** - изоляты *Legionella* spp.

Таблица 5. Аллельный профиль проанализированных штаммов

Штамм	Номер аллеля					
	flaA	pilE	asd	mir	mompS	proA
Philadelphia-1, ATCC 33152	3	4	1	1	14	4
Pyshma-1	2	10	18	10	2	9
Pyshma-2	6	10	3	28	9	1
Pyshma-3	6	10	15	3	19	4
Pyshma-4	6	6	3	28	9	4
Pyshma-5	1	4	3	1	1	5

ному Philadelphia-1. Мишень mir продемонстрировала идентичность Pyshma-2 и Pyshma-4, proA – полное совпадение последовательностей штаммов Philadelphia-1, Pyshma-3 и Pyshma-4. Фрагменты гена mompS совпадают по последовательности у штаммов Pyshma-2 и Pyshma-4.

По полному набору аллелей наибольшее сходство с референтным имеет штамм Pyshma-5, также относящийся к первой серогруппе. Из штаммов, выделенных в районе вспышки заболевания, наибольшее сходство имеют штаммы Pyshma-2 и Pyshma-4.

Полученные результаты свидетельствуют о достаточно широком распространении *L. pneumophila* и *Legionella* spp. в водопроводной и хозяйственной воде в Верхней Пышме. Гетерогенность популяции возбудителя в водных системах характерна для легионелл, находящихся в своей естественной среде обитания. Селекция наиболее эпидемически значимых клонов возбудителя, по-видимому, может происходить как в составе биопленок, так и при непосредственном контакте с альвеолярными макрофагами человека, приводя к наиболее тяжелым случаям пневмоний.

Заключение

Применение различных методов лабораторной диагностики легионеллеза при расследовании эпидемической вспышки пневмонии в городе Верхняя Пышма подтвердило ключевую роль и высокую эффективность метода определения антигена легионелл в моче больных. Возможность получения достоверного результата, позволяющего поставить окончательный диагноз легионеллезной инфекции в течение 1–3 ч, открывает принципиально новые возможности для быстрой корректировки антибиотикотерапии больных с использованием макролидов, для 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 данные ограничения отсутствовали, но спе-

циальные требования к взятию и транспортировке материала на легионеллез могли оказать влияние на результаты бактериологического исследования. Культура выделена лишь из материала от одного пациента. Метод определения IgM-антител в сыворотке крови, так же 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. Быстрый анализ эпидемиологической ситуации с учетом возможных путей передачи возбудителя в сочетании с грамотным применением современных алгоритмов лабораторной диагностики легионеллеза позволил в течение 3 дней (27–29 июля) установить окончательный этиологический диагноз эпидемической вспышки.

Анализ распространения возбудителя в потенциально опасных водных системах Верхней Пышмы показал достаточно высокую эффективность сочетания бактериологических методов и ПЦР-РВ. Культуры легионелл были выделены в 5 образцах

окружающей среды, а с помощью ПЦР-РВ присутствие легионелл показано в 13 из 18 образцов. Результаты подтверждают необходимость организации количественного профилактического мониторинга легионелл в потенциально опасных водных объектах с особым акцентом на выявление наиболее эпидемически значимых штаммов *L. pneumophila* серогруппы 1.

Внедрение стандартов лабораторной диагностики легионеллеза с особым акцентом на выявление антигена легионелл в моче больных в первые дни заболевания, наряду с организацией мониторинга возбудителя в потенциально опасных водных системах в Российской Федерации, позволит не только быстро и достоверно выявлять спорадические случаи и эпидемические вспышки легионеллезной этиологии, осуществлять своевременное и эффективное лечение больных, но и обеспечит своевременное выявление потенциальных очагов легионеллезной инфекции и проведение необходимых противоэпидемических мероприятий.

Литература

1. Edelstein P.H. Antimicrobial therapy for Legionnaires Disease: time for a change. *Ann Intern Med* 1998; 129:328-9.
2. WHO recommended surveillance standarts. 1999.
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. Multi-center evaluation of the biotest legionella urinary antigen test. *Clin Microbiol Infect* 1998; 4:359-65.
6. Тартаковский И.С., Темужникова Н.Д., Карпова Т.И. Легионеллез: проблемы и перспективы лабораторной диагностики. *Проблемы особоопасных инфекций* 2005; (2):17-23.
7. Методические указания по выявлению бактерий *Legionella pneumophila* в объектах окружающей среды. МУК 4.2.22-17-07. 2007.
8. Gaia V., Norman 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; 43:2047-52.
9. Михайлова Д.О., Лещенко И.В., Бобылева З.Д., Скляр М.С., Бубнова Е.М. Первая вспышка легионеллезной инфекции в Свердловской области. Алгоритм диагностики и лечения. *Уральский Медицинский Журнал* 2007; 8:4-10.
10. Harrison T. Taylor A. A laboratory manual for Legionella. John Wiley & Sons Ltd. 1988.