

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель Министра
Главный государственный санитарный
врач
Республики Беларусь


И.В. Гаевский

« 8 » *сентября* 2015 г.

Регистрационный № 011-1115

«ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ЛЕГИОНЕЛЛЕЗА. МЕТОДЫ ОБНАРУЖЕНИЯ ЛЕГИОНЕЛЛ В ОБЪЕКТАХ ВОДНОЙ СРЕДЫ»

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии»; Государственное учреждение образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования»; Государственное учреждение «Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья»; Государственное учреждение «Минской городской центр гигиены и эпидемиологии».

АВТОРЫ: к.м.н., доцент Красько А.Г., к.м.н., доцент Тонко О.В., д.м.н., профессор Коломиец Н.Д., Сержант Е.А., к.м.н. Ханенко О.Н., д.м.н., доцент Романова О.Н., к.м.н. Рустамова Л.М., Левшина Н.Н., Федорович Е.В., Фидаров Ф.М., Молочкова Я.В.

Минск, 2015

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) изложены методы лабораторной диагностики легионеллезной инфекции, которые могут быть использованы в комплексе медицинских услуг, направленных на диагностику и профилактику легионеллеза.

Настоящая инструкция предназначена для врачей-бактериологов и иных специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам с легионеллезной инфекцией и/или осуществляющих государственный санитарный надзор.

ПЕРЕЧЕНЬ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ, РЕАКТИВОВ И ПРИБОРОВ

Оборудование и средства измерения:

- весы электронные (предел измерений 210 г., погрешность $\pm 0,001$ г) или аналогичные (торсионные, др.),
- рН метр – диапазон рН от 1 до 14, точность 0,01 рН,
- шкаф сушильный стерилизационный, поддерживающий температуру $160(\pm 5)^{\circ}\text{C}$,
- термостат суховоздушный, поддерживающий температуру $37(\pm 1)^{\circ}\text{C}$,
- CO_2 -инкубатор или анаэроустат,
- стерилизатор паровой,
- дистиллятор, обеспечивающий качество дистиллированной воды ГОСТ 6709-72,
- облучатель бактерицидный,
- холодильник с температурой в камере от $+4^{\circ}\text{C}$ до $+8^{\circ}\text{C}$,
- морозильная камера с температурой в камере до -20°C ,
- водяная баня, поддерживающая температуру $+50^{\circ}\text{C}$,
- батометр, предназначенный для взятия проб воды с различной глубины водоемов, с одновременным измерением температуры воды исследуемого слоя, при температуре окружающей среды от $+1$ до $+40^{\circ}\text{C}$ (или аналогичное приспособление),

- прибор для мембранной фильтрации воды с диаметром фильтрующей поверхности 35 или 47 мм,
- универсальная центрифуга для пробирок до 50 мл с роторами 6×50 мл (угловая скорость - до 6000 об./мин.), 12×15 мл (угловая скорость – 3000-6000 об./мин.), 30×2 мл (угловая скорость - до 12000 об./мин.),
- микроскоп биологический,
- микроскоп стереоскопический,
- иммуноферментный анализатор,
- типовая ПЦР-лаборатория.

Вспомогательные изделия и расходные материалы:

- посуда лабораторная (ГОСТ 1770-74),
- пробки различных размеров: силиконовые, резиновые и другие, выдерживающие стерилизацию сухим жаром или автоклавированием,
- тампоны (свабы) в полипропиленовой пробирке в упаковке с аппликатором-палочкой,
- газогенераторные пакеты для факультативных анаэробов,
- мембранные фильтры на основе ацетата целлюлозы/поликарбонатные для микробиологических целей с диаметром пор не более 0,45 мкм и размером диска 35-47 мм или другие фильтрующие мембраны с аналогичной способностью фильтрации, имеющие сертификат качества,
- автоматические пипетки переменного объема.

Реагенты, реактивы и питательные среды:

- кислота соляная ГОСТ 3118-77,
- калий хлористый ГОСТ 4233-77,
- калия гидроокись ГОСТ 24363-80,
- натрий серноватисто-кислый (тиосульфат натрия) 5-водный ГОСТ 27068-86,
- натрий двууглекислый ГОСТ 2156-76,
- перекись водорода ГОСТ 10929,

- спирт этиловый ректифицированный медицинский ГОСТ 5962-67,
- спирт этиловый технический ГОСТ 18300-87,
- активированный уголь Р 72.270.3,
- глицин,
- L-цистеин,
- α-кетоглутаровая кислота,
- пирофосфат железа растворимый,
- полимиксин В сульфат 500000 ед.,
- ванкомицина гидрохлорид,
- циклогексимид,
- ACES-буфер (N-2-ацетамидо-2-аминоэтан-сульфанильная кислота),
- агар микробиологический ГОСТ 17206-84,
- дрожжевой экстракт ГОСТ 171-81,
- селективные питательные среды для выделения легионелл с соответствующими добавками,
- реагенты, необходимые для постановки ПЦР,
- тест-системы для видовой идентификации *Legionella pneumophila* в латекс-агглютинации,
- тест-системы для выявления ДНК *Legionella pneumophila* методом ПЦР в режиме «реального времени»,
- наборы реагентов для ИФА-диагностики легионеллезной инфекции,
- наборы реагентов для РИФ-диагностики легионеллезной инфекции,
- наборы реагентов для определения антигена *Legionella pneumophila* серогруппы 1 в моче иммунохромаграфическим методом.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Клиническая диагностика легионеллезной инфекции, выявление возбудителей легионеллеза в объектах внешней среды, мониторинг водных объектов.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ О ВОЗБУДИТЕЛЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ

Сведения о возбудителе заболевания представлены в Приложении 1.

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ЛЕГИОНЕЛЛЕЗА

1. Взятие биологического материала для исследования.

Взятие биологического материала для бактериологического исследования у пациентов рекомендуется проводить до начала антибактериальной терапии. Основным является материал из респираторного тракта, включающий мокроту, трахеальный аспират, плевральную жидкость, материал, полученный при бронхоскопии. Отбор проб осуществляется в соответствии с общепринятыми методиками. Объем образцов аспирата плевральной жидкости должен быть не менее 1 мл, а бронхоальвеолярного лаважа, трахеального аспирата – по возможности больше.

Взятие мокроты осуществляют утром натощак после выполнения гигиенических процедур при глубоком откашливании в количестве не менее 1 мл в стерильный одноразовый флакон с широким горлом, завинчивающейся крышкой, объемом не менее 50 мл. Сроки доставки – не более 24 ч с момента забора. Хранить при температуре от +4°C до +8°C.

Плевральный экссудат, материал бронхоскопии, полученный стерильно до 10-ого дня болезни в количестве от 0,5 до 5 мл, помещают в стерильную пробирку, плотно закрытую резиновой пробкой, и хранят при температуре от +4°C до +8°C.

Кусочки легочной ткани (биоптаты и аутоптаты) отбирают в объеме не менее 1 см³ и помещают в пробирку со стерильной дистиллированной водой. Транспортировка материала осуществляется как можно быстрее, допускается хранение материала до начала исследования при температуре от +4°C до

+8°C не более 48 часов. Длительное хранение материала (до 1 года) возможно только при температуре -70°C.

Дополнительно для выделения *Legionella spp.* отбирают кровь.

С целью выявления растворимого антигена *L.pneumophila s.1.* отбирают пробы мочи. Для исследования иммунохроматографическим методом взятие проб мочи осуществляют в полипропиленовые контейнеры с резьбой и крышкой. Хранение и транспортировку проб мочи осуществляют в герметично закрытых контейнерах при температуре от +4°C до +8°C в течение 24 часов или замороженными. В случае необходимости образцы могут храниться при температуре от +4°C до +8°C до 14 дней или при -20°C в течение длительного времени для первичного или повторного исследования.

Перед определением антигена легионелл в моче охлажденные или замороженные образцы мочи оставляют в лаборатории до достижения комнатной температуры.

Для выявления специфических иммуноглобулинов в сыворотке отбирают кровь из локтевой вены. Кровь забирают натощак по общепринятой методике в стерильные пробирки с 6% ЭДТА 1:20 в количестве 3-5 мл в первые дни и на 14-21-ый день заболевания (не ранее 10-го дня), с последующим получением сыворотки. Сыворотка не должна быть гемолизированной.

Для исследования методом ПЦР транспортировку материала осуществляют в специальном термоконтейнере с охлаждающими элементами при температуре от +4°C до +8°C в течение 6 часов, в замороженном виде в течение 24 часов. С целью предотвращения повреждения ДНК-мишеней возможно использование транспортной среды. Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала. Недопустимо замораживание образцов цельной крови.

При заборе секционного материала образцы пораженных участков легочной ткани, печени, селезенки (по 2-3 кусочка размером 1x1 см) вырезают обработанным 70%-ным спиртом и прожженными в пламени

спиртовки инструментами, помещают в стерильные пробирки или флаконы, плотно закрывают резиновыми пробками. Транспортировку материалов осуществляют при температуре от +4°C до +8°C в течение 24 часов. Длительное хранение материала (до 1 года) возможно при температуре -70°C.

2. Проведение бактериологического исследования.

Пробоподготовка биологического материала.

Все биологические образцы перед посевом деконтаминируют прогреванием при +50°C 30 минут или обрабатывают кислотным буфером KCl – HCl (Приложение 3).

Мокроту для разжижения и гомогенизации предварительно обрабатывают раствором «Муколизин» (77,4 мМ Na₂HPO₄, 22,6 мМ NaH₂PO₄, 99,4 мМ бета-меркаптоэтанол, 5% азид натрия в конечной концентрации 0,05%). В емкость с мокротой добавляют «Муколизин» в соотношении 5:1 (5 частей «Муколизина» к 1 части мокроты), ориентируясь по градуировке емкости. Затем автоматической пипеткой, используя наконечник с фильтром, отбирают 1 мл разжиженной мокроты, помещают в пробирку с завинчивающейся крышкой или в микроцентрифужную пробирку с защелкой объемом 1,5 мл и центрифугируют при 10 000 об./мин. в течение 10 мин. Затем полностью удаляют надосадочную жидкость, осадок ресуспендируют в фосфатном буфере или 0,9% физиологическом растворе, доводя общий объем пробы до 1 мл.

При подготовке к высеву жидкие образцы разводят 1:10 фосфатным буфером (рН – 7,2) или 0,9% физиологическим раствором. Высевают разведенный и цельный образец в количестве 0,2 мл.

Макроаутоптаты массой 1 г растирают в стерильной фарфоровой ступке пестиком и готовят 10% суспензию ткани в фосфатном буфере (рН 7,2). Через ватный тампон отбирают надосадочную жидкость в объеме 1 мл стерильной пипеткой или автоматическим дозатором со стерильным наконечником с аэрозольным барьером в стерильные пробирки.

Подготовленную таким образом суспензию высевают на среды в количестве 0,1 мл.

Посев на питательные среды.

1 этап. Подготовленный для исследования материал засевают на питательные среды, предназначенные для культивирования легионелл, с обязательным добавлением ACES-буфера, L-цистеина и растворимого пирофосфата железа. С этой целью применяют питательные среды с соответствующими ростовыми и селективными добавками, внесенными в государственный реестр Республики Беларусь.

Для ингибирования роста посторонней микрофлоры посевы осуществляют на питательные среды с добавлением смеси антибиотиков, рекомендуемой фирмой-производителем.

Посевы инкубируют во влажной атмосфере при температуре $+37\pm 1^{\circ}\text{C}$, рост некоторых видов стимулирует присутствие 2,5-3% CO_2 . Рост колоний из клинического материала наблюдается не ранее чем через 3-5 суток. Максимальное количество видимых колоний обычно вырастает на 8-10-е сутки. Подозрительные колонии просматривают на чашках с помощью бинокулярного стереомикроскопа. При этом колонии легионелл имеют ровные края, они могут быть белого, серо-голубого, светло-пурпурного, реже – коричневого, лимонного или ярко-красного цвета.

2 этап. При подозрении на рост легионелл колонии пересевают на среду с ростовыми добавками и на контрольную среду без добавок, не поддерживающую рост легионелл (контрольная среда). В качестве контрольной среды используют среду для культивирования легионелл, но без добавления L-цистеина и растворимого пирофосфата железа либо соответствующей ростовой добавки фирмы-производителя. Рост во втором пассаже на специальной среде при отсутствии роста на контрольной позволяет дать предварительный ответ о наличии в материале возбудителя легионеллеза.

3 этап. На селективных средах колонии легионелл вырастают на 3-5-е сутки. Диаметр колоний 1-2 мм, плоско-выпуклые, гладкие с острым краем, поверхность колоний гранулярная или блестящая, серовато-голубоватого цвета. В мазках, окрашенных по Граму, легионеллы выглядят как грамотрицательные палочки длиной 2-5 мкм; длина клеток в мазках, приготовленных из 4-5-суточных культур, может достигать 10-15 мкм.

Ускоренную идентификацию легионелл проводят на основании морфологии колоний, наличия роста на среде с ростовыми добавками и отсутствия роста на контрольной среде (без добавок), окраски бактерий по Граму.

4 этап. Для определения принадлежности выросших колоний к виду *Legionella pneumophila* и серогруппы используют реакцию латекс-агглютинации. С помощью бактериологической петли отбирают подозрительные колонии, выросшие на селективной среде с ростовыми добавками, тщательно суспендируют их в лунках с физиологическим раствором 2 мин. Затем в лунки добавляют соответствующие латексные реагенты. В каждой лунке латексную суспензию тщательно перемешивают с помощью стеклянной палочки (для каждой лунки отдельная) и, осторожно покачивая пластину, наблюдают за появлением агглютинации в течение 2 мин. Размер агглютината и скорость его появления переменна и зависит от концентрации антигена легионелл в суспензии. В качестве положительного контроля используют культуру *Legionella pneumophila* или соответствующий антиген, в том числе коммерческого производства.

Для реакции латекс-агглютинации могут использоваться различные коммерческие тест-системы, постановка и учет реакции проводятся согласно инструкции по применению к набору реагентов.

Для дальнейшей идентификации легионелл используются молекулярно-биологические методы: ПЦР в режиме реального времени, ПЦР-амплификация с последующим секвенированием, PFGE-анализ, типирование методом мультилокусного секвенирования и пр. С

диагностических праймеров амплифицируются фрагменты генов *tip*-белка и/или 16S rРНК *L.pneumophila*. Метод специфичен для *L. pneumophila*.

Для ПЦР в режиме реального времени могут использоваться различные коммерческие тест-системы. Постановка и учет реакции проводятся согласно инструкции по применению к набору реагентов.

Окончательную идентификацию легионелл до вида и сероварианта проводят в ГУ РЦГЭиОЗ и ГУ РНПЦ эпидемиологии и микробиологии.

3. Определение растворимых антигенов в моче.

Методом выявления антигена легионелл в моче является иммунохроматографический тест, используемый для быстрого и достоверного подтверждения диагноза легионеллезной инфекции, вызванной *L. pneumophila* серогруппы 1. Растворимый антиген выявляется в моче заболевших, начиная с третьего дня болезни и может быть обнаружен в течение нескольких последующих месяцев (до 1 года). Для постановки теста применяют коммерческие наборы. Постановка реакции осуществляется в соответствии с инструкцией по применению производителя.

4. Определение специфических антител к *L. pneumophila*.

Иммуноферментный анализ (ИФА) или реакция иммунофлюоресценции (РНИФ) в различных методиках постановки применяются для специфического выявления антител к легионеллам в сыворотке больных.

Для проведения ИФА и РНИФ используются коммерческие тест-системы. Постановка и учет реакций проводятся в соответствии с инструкциями по применению к наборам реагентов.

5. Интерпретация результатов исследований.

Интерпретация результатов лабораторных исследований осуществляется в соответствии с алгоритмом, изложенным в Приложении 2.

МЕТОДЫ ОБНАРУЖЕНИЯ ЛЕГИОНЕЛЛ В ОБЪЕКТАХ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ

1. Отбор, хранение и транспортировка проб из объектов водной среды.

1.1. Отбор проб.

Отбор проб воды осуществляют в соответствии с требованиями действующей нормативно-правовой документации на методы отбора. Отбор прочих проб из объектов внешней среды осуществляется в соответствии с данной инструкцией.

Из одной точки отбирают 1 пробу воды объемом 0,5 л (при расследовании эпидемической вспышки – 2 и более проб).

Для исследования пробы воды берут из водопроводной сети, систем охлаждения, технологических циклов, емкостей для хранения воды, бассейнов, фонтанов и др., а также разнообразных естественных и искусственных водоемов: рек, ручьев, озер, прудов, мелиоративных каналов, сточных вод, термальных источников.

Пробы воды для бактериологического исследования на наличие легионелл отбирают в стерильные емкости. Для отбора проб воды используют специально предназначенную для этих целей одноразовую посуду или емкости многократного применения, изготовленные из материалов, не влияющих на жизнедеятельность микроорганизмов.

Емкости должны быть оснащены плотно закрывающимися пробками (силиконовыми, резиновыми или из других материалов) и защитным колпачком (из алюминиевой фольги, плотной бумаги), или завинчивающимися крышками с резиновыми уплотнителями. С целью дехлорирования воды в стерильные флаконы емкостью 500 мл вносят 2 мл стерильного 1,5 %-ного раствора гипосульфита натрия или для забора используют емкости, содержащие кристаллы гипосульфита натрия из расчета 20 мг на 1 л воды.

Поверхностные и глубинные пробы отбирают специальными батометрами и другими сертифицированными приспособлениями, предназначенными для этих целей.

Забор материала осуществляют стерильно, избегая соприкосновения пробки и края емкости с любыми поверхностями. После наполнения емкость закрывают стерильной пробкой, обеспечивающей герметичность и не намокающей при транспортировке (ватные пробки не применять), и стерильным колпачком. Резервуар с пробой не следует заполнять полностью, после закрытия пробкой над поверхностью воды должно оставаться пространство с воздухом.

Отбор проб из крана. Перед тем, как приступить к спуску воды и отбору проб, следует снять с крана все дополнительные устройства, например, фильтры, вкладыши, предохраняющие от разбрызгивания, удлинители и т.п. Краны и наконечники труб, из которых отбираются пробы для микробиологических исследований, должны быть дезинфицированы, лучше всего путем обжигания огнем при использовании пропитанного спиртом ватного тампона. Если это невозможно, наконечник трубы следует погрузить в раствор дезинфицирующего средства. Краны для отбора проб должны содержаться в хорошем техническом состоянии. Время спуска воды составляет 2-3 минуты. При исследовании воды, поступающей из эксплуатационных, регулирующих резервуаров, водонагревателей и других устройств, пробы должны отбираться из подводящей и отводящей трубы, как можно ближе к резервуару либо устройству.

Для исследования также берут конденсат и смывы с внутренней поверхности кондиционеров, санитарно-технического и медицинского оборудования ЛПО, водопроводных кранов, головок душа, шлангов замкнутых водных систем охлаждения, емкостей для хранения воды, медицинских и бытовых приборов, связанных с распылением или разбрызгиванием, а также с открытых поверхностей в зданиях или в других местах предполагаемых вспышек или спорадических случаев легионеллеза.

Отбор проб производят с помощью стерильных ватных тампонов. Тампоны, увлажненные стерильным физиологическим раствором, проводят по поверхности и помещают в стерильную пробирку, содержащую 5 мл физиологического раствора. При контроле мелких предметов смывы забирают с поверхности всего предмета. При контроле предметов с большой поверхностью смывы проводят в нескольких местах исследуемого предмета площадью в 100-200 мм².

С учетом способности легионелл к образованию биопленок на поверхности водопроводного, промышленного, лабораторного и иного оборудования, связанного с циркуляцией и хранением воды, соответствующие участки поверхности также могут исследоваться на наличие легионелл. Соскобы влажных биопленок с поверхности, находящейся под водой или на границе соприкосновения воды и воздуха, берут сухими стерильными тампонами и помещают во флакон или пробирку, содержащими стерильный физиологический раствор. Соскобы биопленок с высохшей поверхности берут тампонами, смоченными стерильным физиологическим раствором, и помещают в пробирку, содержащую стерильный физиологический раствор.

1.2. Условия хранения и транспортировки проб.

Отобранные пробы маркируют и сопровождают документом отбора проб с указанием места, времени забора, фамилии специалиста, отбравшего пробы, и другой информации (температура воды, погодные условия).

Доставку проб осуществляют в контейнерах, защищенных от солнечного света, при температуре от +6°C до +24°C. При соблюдении указанной температуры транспортировки срок начала исследований от момента отбора проб не должен превышать 48 ч. Если проба содержит дезинфектанты, и их нейтрализация не проведена сразу же после отбора, анализ проводят в течение 4 ч после забора.

Хранение концентрированных проб воды при температуре от +6°C до +8°C возможно в течение 3-х месяцев. При температуре ниже +6°C легионеллы переходят в некультивируемое состояние.

Концентрированные смывы с поверхностей могут храниться при температуре от +6°C до +8°C в течение 30 дней.

1.3. Подготовка проб к исследованию.

В случае сильной загрязненности исходного образца воды механическими или масляными примесями, определяемыми визуально, его предварительно фильтруют на стеклянной воронке через стерильный ватно-марлевый или бумажный фильтр. Подготовленную таким образом воду пропускают через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм. После окончания фильтрации мембранные фильтры переносят обожженным анатомическим пинцетом в стерильный флакон или стерильный пластиковый пакет объемом 100 мл с 10 мл стерильного физиологического раствора. Перед фильтрованием каждой новой пробы прибор обеззараживают.

Для десорбции микрофлоры с фильтров флакон помещается на встряхиватель или качалку на 10-15 мин при температуре +18-25°C. Фильтр внутри пластикового пакета растирается вручную в течение 1 мин. Далее смыв с поверхности фильтра помещают в центрифужную пробирку объемом 15 мл и центрифугируют при 3000-6000 об./мин. в течение 30 мин. Надосадочную жидкость полностью удаляют для последующего обеззараживания. Осадок тщательно ресуспендируют стерильной пипеткой в 1 мл физиологического раствора и переносят в стерильную пробирку.

Подготовленную таким образом пробу помещают в холодильную камеру с температурой от +6°C до +8°C, до окончания исследования.

Для снижения уровня загрязненности сконцентрированной пробы посторонней микрофлорой одну ее часть подвергают прогреванию, а другую обрабатывают кислотным буфером, приготовленным в соответствии с указаниями, изложенными в Приложении 3 к инструкции.

Для прогревания из подготовленного сконцентрированного образца отбирают 0,2 мл и переносят в стерильную пробирку, после чего помещают пробирку на водяную баню при +50°C и прогревают в течение 30 мин.

Для обработки кислотным буфером 0,2 мл сконцентрированного образца переносят в стерильную пробирку и добавляют 0,2 мл раствора кислотного буфера KCl-HCl, pH 2.2, инкубируют при комнатной температуре в течение 4-5 мин. Кислотную обработку проводят непосредственно перед посевом на плотные питательные среды.

Образцы биопленок, смывы с поверхностей подвергают концентрированию с помощью центрифугирования, кислотной и термической обработки аналогично концентрированию проб воды.

2. Проведение бактериологического исследования.

Бактериологические исследования осуществляются по схеме в соответствии с Приложением 4 к инструкции.

2.1. Начальное бактериологическое исследование.

По 0,1 мл образца: концентрированного, обработанного кислотным буфером и прогретого при +50°C – высевают на чашки с питательной средой с ростовыми и селективными добавками. Образец распределяется по поверхности питательной среды шпателем. Чашки инкубируют при +37±1°C до 7 дней во влажной атмосфере и, по возможности, в присутствии 2,5% CO₂.

Просмотр чашек начинают с 3-х суток, хотя из воды колонии легионелл могут вырастать на 5-7-е сутки и в более поздние сроки. В случае массивной контаминации проб посторонней микрофлорой, несмотря на кислотную и термическую обработку, не позволяющей проводить подсчет колоний, сконцентрированную пробу разводят в 100 раз и производят повторный высев.

Подозрительные на легионеллы колонии выявляют при стереомикроскопическом просмотре чашек или под лупой. Колонии легионелл обычно имеют вросший центр, гранулярную или блестящую поверхность, серовато-голубоватую, иногда зеленоватую окраску и с

фиолетовым оттенком. Колонии легионелл на 3-5-е сутки небольшие, диаметром 2-4 мм, плоско-выпуклые, гладкие с острым краем.

2.2. Идентификация бактерий рода *Legionella spp.*

Идентификацию бактерий рода *Legionella spp.* проводят в соответствии со схемой, изложенной в Приложении 5 инструкции. Используют окраску мазков по Граму и пересев на питательную среду с добавкой, поддерживающей рост легионелл и аналогичную среду без ростовой добавки, на которой колонии легионелл не растут.

Для этого с каждой чашки отбирают 2-3 подозрительные колонии, которые отсевают параллельно на указанные среды и инкубируют при $+37\pm 1^\circ\text{C}$ в течение 48 часов, а также готовят мазки для окраски по Граму.

В мазках легионеллы выглядят как небольшие грамтрицательные палочки длиной 2-5 мкм. В мазках с 4-5-дневных колоний длина легионелл может достигать 10-15 мкм, в ряде случаев встречаются нитевидные формы длиной до 20-25 мкм.

Идентифицированные подобным образом колонии относят к роду *Legionella*. Типичные для *Legionella spp.* колонии подсчитывают количественно для последующего определения количества легионелл в 100 мл воды. Для смывов и биопленок, в которых возбудитель присутствует, как правило, в высоких концентрациях, проводят только качественную оценку обсемененности.

2.3. Определение количества легионелл в исследуемом материале.

Для определения количества легионелл в исследуемой пробе берут чашку с посевом предварительного сконцентрированного материала без тепловой и кислотной обработки. Для расчета используют следующую формулу:

$$X = \frac{a \cdot b}{c} \cdot \frac{1}{s}, \text{ где}$$

X - количество легионелл на 1 л в исследуемой пробе,

a - количество колоний легионелл, выросших на чашке,

b - объем концентрата пробы (по завершении этапов фильтрации и центрифугирования), мл,

c - объем, высеянный на чашку, мл,

s - объем исходной пробы, л.

2.4. Идентификация вида *Legionella pneumophila*.

Легионеллы не ферментируют углеводы, разжижают желатин, не образуют уреазу, не восстанавливают нитраты, положительны в пробе на каталазу, переменны в пробе на оксидазу (таблица 1). Отсутствие способности к ферментации углеводов у бактерий *Legionella spp.* не позволяет быстро и достоверно провести идентификацию легионелл до вида на основе биохимических тестов. Для быстрой идентификации бактерий *Legionella pneumophila* используют реакцию латекс-агглютинации с моновалентными и групповыми сыворотками, полимеразную цепную реакцию с видоспецифичными праймерами, в том числе, в режиме реального времени.

Таблица 1 – Фенотипические признаки *Legionella spp.*

Признак	<i>L. pneumophila</i>	<i>L. bozemanii</i>	<i>L. dumoffii</i>	<i>L. micdadei</i>	<i>L. feeleii</i>	<i>L. longbeachae</i>
Рост на ВСУа-агаре	+	+	+	+	+	+
Рост на кровяном агаре или на среде ВСУа без L-цистеина	-	-	-	-	-	-
Каталаза	+	+	+	+	+	+
Восстановление нитратов	-	-	-	-	-	-
Ферментация углеводов	-	-	-	-	-	-
Гидролиз гиппурата натрия	+	-	-	-	-	-
Аутофлюоресценция	-	+	+	-	-	-
Желатиназная	+	+	+	-	-	+

активность						
Образование коричневого пигмента на среде, содержащей тирозин	+	+	+	-	+	+
β -лактамазная активность	+	В	+	-	В	В
Оксидаза	В	В	-	+	В	+

Примечание: "+" - положительный; "-" - отрицательный; "В" - вариабельный

Идентификация легионелл методами реакции латекс-агглютинации и нРИФ описана в разделе «Лабораторная диагностика легионеллеза» инструкции.

Окончательную идентификацию легионелл до вида и серовара проводят в ГУ РЦГЭиОЗ и РНПЦ эпидемиологии и микробиологии.

2.5. Выявление легионелл методом ПЦР.

Метод используют для ускоренного качественного выявления легионелл в пробах из объектов внешней среды. Для анализа используют 0,1 мл предварительно сконцентрированного образца.

Обеззараживание исследуемого материала осуществляют следующим образом: сконцентрированную пробу из объектов внешней среды переносят в микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл и добавляют 300 мкл лизирующего буфера, содержащего 6М гуанидинтиоцианата, инкубируют при +65°C в течение 10 мин. После такой обработки пробы считаются обеззараженными.

Выделение ДНК. Из подготовленных таким образом проб из объектов внешней среды проводят выделение ДНК, используют сертифицированные наборы, в основе которых лежит метод сорбции ДНК на силикагеле в присутствии гуанидинтиоцианата. Работу осуществляют в соответствии с инструкцией, прилагаемой к набору.

Постановка ПЦР. Для постановки ПЦР используют сертифицированные ПЦР-тест-системы, основанные на выявлении

фрагментов генов, специфичных для бактерий рода *Legionella spp.* и вида *L. pneumophila*. Исследования и учет результатов выполняют согласно прилагаемой к тест-системе инструкции методом электрофореза в агарозном геле.

Качественное исследование методом ПЦР на наличие *Legionella pneumophila* может быть использовано для предварительного ориентировочного скрининга проб воды, так как широкое распространение некультивируемых форм легионелл, не представляющих опасности для человека, в естественных и искусственных водных системах не позволяет в данном случае оценить уровень контаминации легионеллами объектов окружающей среды.

2.6. Исследование проб с помощью ПЦР в режиме реального времени.

Метод используют для ускоренного количественного выявления легионелл в пробах из объектов внешней среды.

Выделение нуклеиновых кислот для последующего анализа проводят с помощью набора для выделения ДНК/РНК из водных образцов в соответствии с инструкцией изготовителя. Для дальнейшего анализа используют наборы для количественного определения ДНК *Legionella spp.* и *Legionella pneumophila*. Расчет количества ДНК легионелл в исследуемом образце проводят в соответствии с инструкцией по применению набора реагентов. Окончательный результат в таком случае представляют в виде числа геномных копий на 1 л воды. При положительном ответе, свидетельствующем о наличии в пробе легионелл в количестве 1×10^3 геномных копий на 1 л и выше, необходимо его подтверждение выделением культуры возбудителя бактериологическим методом.

ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ О ВОЗБУДИТЕЛЕ ЛЕГИОНЕЛЛЕЗА

Легионеллез – сапронозная инфекция, характеризующаяся лихорадкой, выраженной общей интоксикацией, тяжелым течением, поражением легких, центральной нервной системы, органов пищеварения. Известно более 50 видов легионелл, из которых для 22-х доказана роль в инфекционной патологии человека. Большинство случаев легионеллеза связаны с видом *L.pneumophila*, насчитывающий 16 серогрупп, при этом около 80% случаев заболевания обусловлены легионеллами серогруппы 1. *Legionella pneumophila* вызывает острые тяжелые пневмонии с высоким процентом летальных исходов (5-25 %) и другие респираторные заболевания. Среди других представителей рода *Legionella* в качестве микроорганизмов-оппортунистов, вызывающих заболевание при нарушении клеточного иммунитета и/или на коморбидном фоне, следует отметить *L. micdadei*, *L. longbeachae*, *L. dumoffii* и *L. bozemanii*. Остальные виды *Legionella spp.* не патогенны для человека.

Возбудителя легионеллеза относят к роду *Legionella*, семейству *Legionellaceae*. *Legionella pneumophila* – грамтрицательная палочка диаметром 0,5-0,7 мкм и длиной 2-5 мкм, в ряде случаев встречаются нитевидные формы длиной до 20-25 мкм. Бактерии не образуют спор, микроцист и капсул, аэробы. Микроорганизм подвижен за счет одного, двух или большего числа жгутиков.

Легионеллы – факультативные внутриклеточные паразиты. В организме человека они размножаются преимущественно в альвеолярных макрофагах, полиморфно-ядерных нейтрофилах и моноцитах крови. Вследствие ингаляции микробного аэрозоля или аспирации легионеллы попадают в легкие, где и происходит их контакт с альвеолярными макрофагами.

В природных условиях легионеллы обитают повсеместно в пресноводных водоемах, преимущественно в некультивируемой форме, и паразитируют в амебах и других простейших, не представляя серьезной опасности для человека, поскольку накапливаются в незначительных количествах (не более 10^3 КОЕ/л). При температуре воды выше $+60^\circ\text{C}$ легионеллы не выживают, от $+60^\circ\text{C}$ до $+50^\circ\text{C}$ – теряют способность к размножению и постепенно погибают, ниже $+20^\circ\text{C}$ – остаются в состоянии вынужденного покоя, не размножаясь, и лишь диапазон температур $+20$ - $+45^\circ\text{C}$ является благоприятным для их размножения.

Высокие адаптивные способности легионелл позволяют успешно колонизировать искусственные водные системы – системы охлаждения и кондиционирования, градирни, компрессорные устройства, джакузи, фонтаны, медицинское оборудование и др. Условия для размножения легионелл в искусственных водных системах более благоприятны, чем в естественных, что приводит к накоплению в них возбудителя в высокой концентрации. Легионеллы активно колонизируют синтетические и резиновые поверхности промышленного, водопроводного, медицинского оборудования с образованием биопленок, в которых легионеллы значительно более устойчивы к действию дезинфицирующих веществ.

Путь передачи легионеллезной инфекции – воздушно-капельный, основной фактор передачи – мелкодисперсный аэрозоль.

Важными факторами являются восприимчивость человека и вирулентность штамма легионелл. Величина инфицирующей дозы не установлена, однако известно, что заражение здоровых людей происходит при наличии значительного количества легионелл в воде (более 10^4 КОЕ/л). После экспозиции легионеллезная пневмония (болезнь легионеров) развивается у 5-10% лиц, в то время как лихорадка Понтиак может развиваться у 80-100% людей, оказавшихся в зоне действия контаминированного источника. Отсутствие рецепторов на поверхности легионелл, с помощью которых они могли бы закрепиться в клетках мерцательного эпителия

слизистой оболочки дыхательных путей, объясняет неконтагиозную природу данного заболевания – данные о носительстве и персистенции легионелл отсутствуют.

При спорадическом легионеллезе и отдельных нозокомиальных вспышках заболевания возможна аспирация воды, контаминированной легионеллами без образования аэрозоля (бассейны, емкости для хранения и транспортирования воды и др.).

Эпидемические вспышки и спорадические случаи легионеллеза выявляют повсеместно. Особое значение уделяется случаям болезни легионеров, возникающим во время поездок, путешествий и диагностируемым после возвращения из них. Инкубационный период составляет от 2 до 10 дней. Более 30% случаев спорадического легионеллеза, многочисленные эпидемические вспышки в гостиницах, на круизных судах послужили причиной создания международной системы эпидемиологического надзора случаев легионеллеза, связанного с поездками.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ЛЕГИОНЕЛЛЕЗА

Диагноз легионеллеза в случае острой инфекции нижних дыхательных путей (клинически и рентгенологически подтвержденной) считается **установленным** при:

- 1) Выделении культуры легионелл из отделяемого респираторного тракта или легочной ткани;
- 2) Определении растворимого антигена *L.pneumophila* серогруппы 1 в моче иммунохроматографическим методом;
- 3) Определении специфических антител к *L. pneumophila*. Положительным считается 4-кратное и более нарастание титра антител в сыворотке крови реконвалесцентов по сравнению с титром сыворотки, взятой в острый период заболевания.

Диагноз считается **предположительно установленным**:

- 1) При получении положительного результата исследования методом ПЦР;
- 2) При обнаружении специфических антител в одиночной сыворотке к *L.pneumophila* и другим видам легионелл.

Выделение культуры возбудителя является единственным методом, устанавливающим окончательный диагноз в случае инфекции, вызываемой другими видами *Legionella spp.*

Основным методом, позволяющим осуществлять в настоящее время своевременную диагностику и мониторинг легионеллезной инфекции, является определение легионеллезного антигена в моче иммунохроматографическим методом.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД И РАСТВОРОВ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ЛЕГИОНЕЛЛ

1. Для выделения легионелл используют стандартную среду – буферный угольно-дрожжевой агар (БУДРАГ, ВСУЕа) с ростовой и селективной добавкой. Среды промышленного изготовления готовятся в соответствии с прописями на этикетке или в соответствии с инструкцией изготовителя.

Допускается применение сред лабораторного приготовления. Их подготовку осуществляют по следующей схеме:

Компоненты основы среды БУДРАГ (на 1 л):

- Дрожжевой экстракт – 10,0 г,
- Агар – 13,0 г,
- Активированный уголь – 2,0 г,
- а-Кетоглутаровой кислоты калийная соль – 1,0 г,
- АСЕС-буфер, рН 6,9 – 10 г,
- 1М раствор КОН – 40 мл,
- Глицин – 3 г.

Компоненты ростовой добавки (на 1 л):

- L-цистеин – 0,4 г,
- Пирофосфат железа растворимый – 0,25 г.

Компоненты селективной добавки (на 1 л):

- Полимиксин В – 80000 ед.,
- Ванкомицин – 5 мг,
- Циклогексимид – 80 мг.

К навеске ACES-буфера добавляют 500 мл дистиллированной воды и выдерживают на водяной бане при +50°C, помешивая до полного растворения. К 440 мл дистиллированной воды добавляют 40 мл 1М раствора КОН и осторожно смешивают с первым раствором. Полученным раствором заливают смесь навесок дрожжевого экстракта, агара, активированного угля, калийной соли α-кетоглутаровой кислоты и глицина и выдерживают на водяной бане при +50°C, осторожно помешивая до полного растворения всех компонентов. Среду автоклавируют 15 мин при +121°C, охлаждают до +50°C и добавляют стерильно компоненты ростовой и селективной добавки. Растворяют в 10 мл дистиллированной воды каждую из навесок L-цистеина и пирофосфата железа растворимого, фильтруют через мембранный фильтр и добавляют в среду. Концентрированные растворы антимикробных препаратов также добавляют в среду до требуемой конечной концентрации.

Конечное значение pH среды $6,95 \pm 0,02$. Среду разливают в стерильные чашки Петри по 25 мл и подсушивают в термостате при $+37 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение часа. Среда имеет характерный черно-серый цвет.

В качестве контрольной среды, не поддерживающей рост легионелл, используют среду БУДРАГ без добавления селективной и ростовой добавки. Для посева колоний легионелл и дальнейшего культивирования используют среду БУДРАГ с ростовой, но без селективной добавки.

Для культивирования легионелл можно использовать среду СЭЛ, легионеллбакагар, а также шоколадный агар, используемый для культивирования возбудителя туляремии. Ростové потребности легионелл и возбудителя туляремии весьма близки. Но легионеллы исключительно требовательны к pH среды (6,95), который удается сохранить в условиях длительного (до 10 дней) выделения из окружающей среды за счет компонента среды БУДРАГ – ACES-буфера, отсутствующего в других прописях сред. Музейные штаммы легионелл не столь требовательны к pH и растут на более широком спектре питательных сред, в том числе и без ACES-буфера.

При использовании для выделения легионелл сред, отличных от БУДРАГ, необходимо осуществлять дополнительный контроль среды с помощью вирулентного штамма *Legionella pneumophila* серогруппы 1 *Philadelphia 1* (LD50 для морских свинок не более 10^5 КОЕ при высеве на среду БУДРАГ). Количество колоний на проверяемой партии среды должно соответствовать титру контрольной вирулентной культуры, в качестве которой используется селезеночная суспензия морской свинки, зараженной вирулентным штаммом *L. pneumophila Philadelphia 1*. Ампулы с селезеночной суспензией вирулентного штамма *L.pneumophila Philadelphia 1* для проверки качества питательных сред могут храниться в течение 2 лет при -70°C .

2. Для приготовления кислотного KCl-HCl буфера к 39 мл 0,4М раствора HCl добавляют 250 мл 0,4М раствора KCl. Доводят значение pH буфера до 2,2 с помощью 1М раствора KOH. Хранят в темном флаконе при $+4^{\circ}\text{C}$ не более 1 месяца.

СХЕМА ВЫДЕЛЕНИЯ *Legionella spp.* ИЗ ОБЪЕКТОВ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ:
ВЫДЕЛЕНИЕ КУЛЬТУРЫ

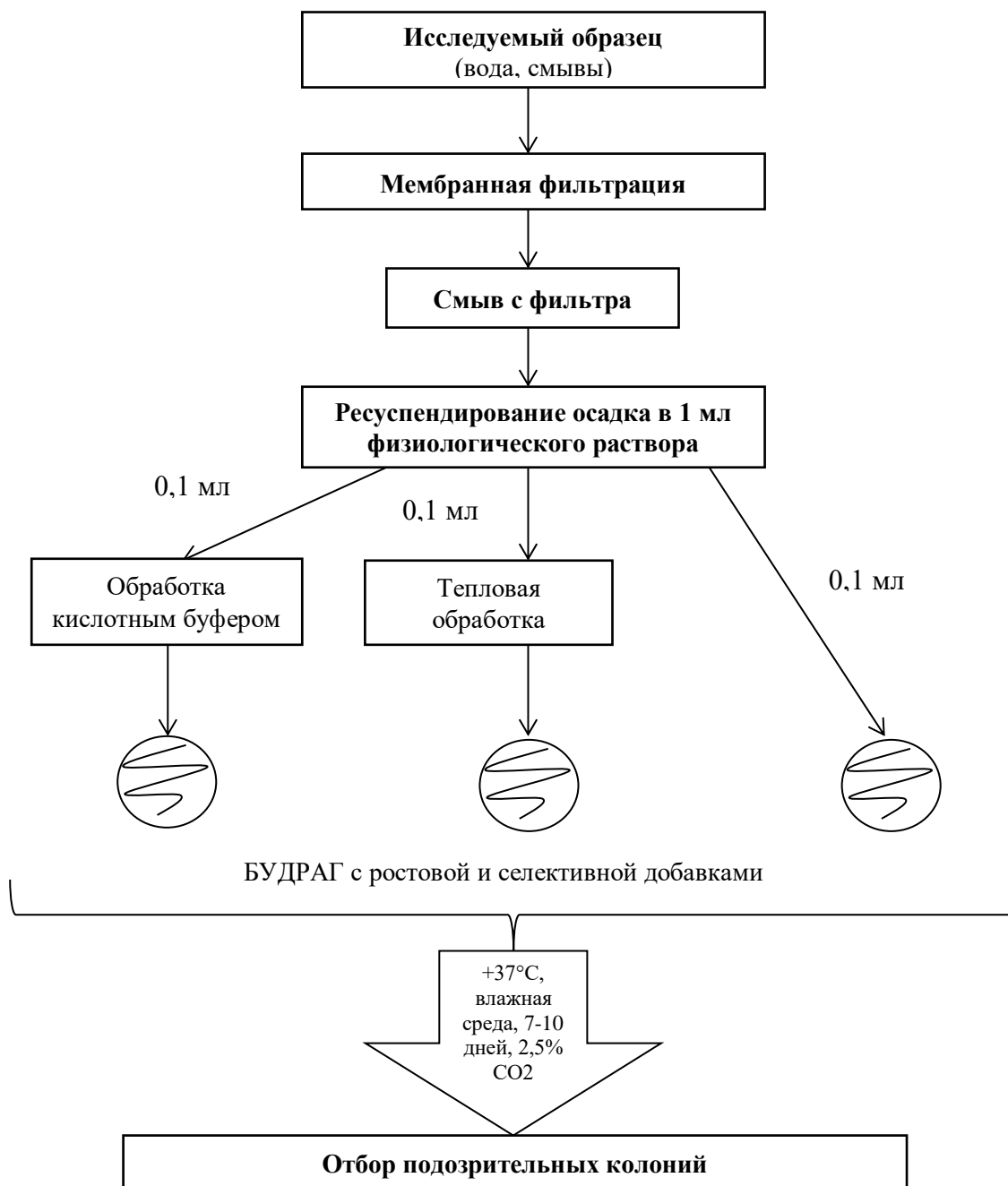


СХЕМА ВЫДЕЛЕНИЯ *Legionella spp.* ИЗ ОБЪЕКТОВ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ:
ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПОДОЗРИТЕЛЬНЫХ КОЛОНИЙ

