

ПИТАННЯ ВИЯВЛЕННЯ ТА ІДЕНТИФІКАЦІЇ ШТАМІВ *LEGIONELLA PNEUMOPHILA* У ВОДІ

С.М. Кузьминський, кандидат мед. наук

ДП “Науковий центр превентивної токсикології, харчової та хімічної безпеки імені академіка Л.І. Медведя МОЗ України”, м. Київ

Резюме. Мета публікації — аналітичний огляд літератури та визначення шляхів подолання існуючих проблем. Інфекції, спричинені *Legionella spp.*, останнім часом розглядаються як зростаюча загроза громадському здоров'ю, пов'язана з високою захворюваністю та летальністю. Відповідно до стандарту ІСО лише ті колонії, які ростуть на БВД-агарі та не ростуть на кров'яному агарі вважають підозрілими на приналежність до роду *Legionella*. Остаточна ідентифікація можлива лише за допомогою ПСР-методу. Проте культуральний метод має ряд обмежень, які роблять його недостатньо придатним для оперативних протиепідемічних заходів. Для спостереження за безпечністю води та профілактики легіонельозу необхідно розробити нові методи, які б поєднували специфічність виявлення легіонел з можливістю розрізнення життєздатних та нежиттєздатних мікробних клітин.

Ключові слова: *Legionella pneumophila*, вода, ідентифікація, ПСР-метод.

Бактерії роду *Legionella* достатньо поширені у зовнішньому середовищі, насамперед у різноманітних водних системах як природних, так і створених людиною та вологому ґрунті [1, 2, 3]. Переважно вони паразитують у клітинах водних амеб та інших найпростіших та не становлять істотної небезпеки для людини (так звані “некультуральні” форми). Оптимальною для розмноження легіонел є температура 25°-45° С, хоча цей процес відбувається і за більш низьких температур. Умови для розмноження легіонел у штучних водних системах (системи охолодження, компресорні пристрої, фонтани, плавальні басейни, гідромасажні ванни та інше) є більш сприятливими, ніж у природних, що призводить до їхнього накопичування у високих концентраціях. На поверхнях водопровідного устаткування в асоціації з іншими бактеріями та найпростішими легіонели утворюють біоплівки, які ефективно захищають їх від впливу дезінфектантів. Останнім часом виявлення *L. pneumophila* набуває все більшої актуальності для санітарної мікробіології харчових продуктів, насамперед при контролюванні безпечності води на виробництві бутельованої питної води та безалкогольних напоїв. Зокрема пропонується включати ці дослідження до переліку рекомендованих для мікробіологічного моніторингу гігієнічного стану виробництва.

До роду *Legionella* належать понад 50 видів, які становлять 71 окрему серогрупу [2, 4]. З них найбільш цікавою для медичної мікробіології є *L. pneumophila* серогрупи 1, яка у 80% випадків є збудником «хвороби легіонерів» — гострої інфекційної пневмонії, яка вперше вразила делегатів з'їзду Американського легіону у Філадельфії в 70-х роках минулого сторіччя [5]. Джерелом інфекції

виявилась вода з системи кондиціонування повітря. Окрім того, щонайменше ще 21 вид легіонел (у т.ч. *L. micdadei*, *L. longbeachae*, *L. dummqfii*, *L. bozemanii*) пов'язують з різноманітними інфекційними захворюваннями переважно в імунокомпрометованих пацієнтів, які знаходяться в лікувальних закладах [6]. Інкубаційний період становить 2-10 днів. Летальність у цих випадках доволі висока [7]. Зараження відбувається шляхом інгаляції інфікованих крапель аерозолію [8, 9]. Висока концентрація в краплинах дрібнодисперсного аерозолію дозволяє збуднику потрапляти до легеневих альвеол, де вірулентні штами легіонел інфікують макрофаги і тривалий час зберігаються в них. Зараження можливе і шляхом ковтання інфікованої води без утворення аерозолію (басейни, ємності для питної води тощо).

Наявність *L. pneumophila* в різноманітних водних системах у кількості до 10² живих клітин/л вважають допустимим, концентрація 10²-10³ свідчить про колонізацію даного об'єкту, яка сама по собі не становить небезпеки, але потребує регулярного мікробіологічного моніторингу, концентрація 10⁴ і більше є ознакою епідемічної загрози, що вимагає проведення дезінфекційних та профілактичних заходів [10]. До 30% спорадичного легіонельозу становлять випадки під час туристичних подорожей (насамперед корабельні круїзи), причому захворювання проявляється після повернення з поїздки. Основним запобіжним заходом є локалізація та знешкодження збудника у водній системі, яка може бути джерелом бактеріального аерозолію. Випадків передачі інфекції від людини до людини не виявлено. Швидко та безпомилково виявлення легіонел у водному середовищі має ключове значення в системі заходів боротьби та

запобігання легіонельозній інфекції.

Бактерії роду *Legionella* є ауксотрофами за L-цистеїном і не ростуть на поживних середовищах без цієї амінокислоти. Ця біологічна особливість використовується в культуральному методі виявлення легіонел у доквіллі. Ізоляти, які ростуть на буферному вугільно-дріжджовому агарі (аналог середовища BCYE), але не здатні до росту на цьому середовищі без L-цистеїну, попередньо ідентифікують як такі, що належать до роду *Legionella* [11, 12]. Проте культуральний (мікробіологічний) метод виявлення легіонел у водному середовищі, який прописаний в стандарті ISO [13] та AFNOR [14], має суттєві обмеження, пов'язані із занадто довгим терміном культивування (7-10 діб), недостатньою селективністю поживних середовищ (можливий ріст нецільових мікроорганізмів), нездатністю виявляти живі, але "некультурабельні" клітини (легіонели, які перебувають в асоціації з амебами) та зменшенням життєздатності легіонел на етапі концентрації та деконтамінації, часткове пригнічення антибіотиками в поживних середовищах [11, 15]. Отже, виявлення легіонел в пробах води, насамперед з природних водойм, є нечастою подією, яка до того ж вимагає тривалого часу та значної трудомісткості [16]. Значно ускладненим також є виявлення культуральним методом мікробних клітин, які мають фізіологічні пошкодження внаслідок дії несприятливих умов довкілля або сублетальних концентрацій дезінфектантів. Успішне отримання чистої культури з низькоконтрамінованого середовища, масивно забрудненого нецільовими мікроорганізмами, вимагає попередньої концентрації (центрифугування або ж фільтрацією) та застосування засобів селекції. До таких належать антибіотики (поліміксин В, ванкоміцин, циклогексамід), прогрівання (50° С 30 хв.) або витримка в кислому середовищі (рН 2,2-5 хв.) [13]. Температура має пріоритетне значення в підвищенні висіваєності легіонел з води [17]. Sanden із співавторами [18] показали, що преінкубація води з життєздатними амебами протягом 7 діб збільшує можливість знахідок *L.pneumophila*. Bartie із співавторами продемонстрували полегшення росту легіонел на селективних середовищах після преінкубації водних концентратів з автохтонними амебами [19].

Видова ідентифікація легіонел також є непро-

стим завданням. Легіонели є хемоорганотрофами (не ферментують вуглеводи), не виявляють уреазної та нітратредуктазної активності [20], отже, традиційні для мікробіології біохімічні методи в даному випадку є малоінформативними, невалідованими і мають обмежене застосування [21]. Більшість штамів розріджують желатин, продукують каталазу, але не продукують оксидазу. *L.pneumophila* та деякі інші види можуть гідролізувати гіпурат [22, 23]. Визнано, що більш точна ідентифікація *L.pneumophila* можлива за допомогою серологічних (латекс-аглоутинія, прямий імунофлюоресцентний метод) та молекулярно-генетичних методів (різноманітні PCR-методи для виявлення 1SrRNA, 5SrRNA, 23SrRNA генів та *mip*-гену, що є геном-потенціатором інфективності *L.pneumophila* для макрофагів [11]. Найбільш прийнятним є поєднання згаданих методів ідентифікації з культуральним методом виявлення *L.pneumophila* [10, 24]. Такий підхід набуває особливої ваги у зв'язку з недавньою публікацією Borges A. із співавторами [25]. Авторами показано, що жоден з 49 штамів, попередньо ідентифікованих культуральним методом як *L.pneumophila* за результатами молекулярно-генетичного дослідження (16SrRNA) не міг бути віднесений до роду *Legionella*. Автори наголошують, що ідентифікація легіонел лише за культуральними ознаками може призвести до хибних результатів, що матиме серйозні наслідки. Кількісну PCR у реальному часі (qPCR) розглядають як альтернативний культуральному мікробіологічному методу виявлення вибагливих бактерій, що повільно ростуть на поживних середовищах. Ампліфікація ДНК легіонел шляхом полімерно-ланцюгової реакції дозволяє за відносно короткий час і за великої кількості проб чітко ідентифікувати більшість видів легіонел, в тому числі і в "некультурабельній" формі. У той же час, недоліком PCR-методу є неможливість розрізнення живих та неживих клітин мікроорганізмів, що істотно ускладнює інтерпретацію результатів.

Отже, PCR-аналіз не може повною мірою замінити класичний мікробіологічний метод. Експрес-методи, які поєднували б специфічну детекцію та виокремлення життєздатних клітин легіонел, лишаються нагальною потребою ефективного моніторингу безпечності води та профілактики легіонельозу.

ЛІТЕРАТУРА

1. Taylor M. *Legionella*, Protozoa and biofilms: Interactions within complex microbial systems /M. Taylor, K.Ross, R.Bentham // *Microb. Ecol.* — 2009. — №58. — P. 538–547.
2. *Legionella impletisoli* sp. nov. and *Legionella yabuuchiae* sp. nov., isolated from doils contaminated with industrial wastes in Japan /H.Kuroki., H.Miyamoto, K.Fukuda, [et al.]//*Syst.Appl.Microbiol.* — 2007. — №30. — P. 273–279.
3. Alp E. Ventilator associated pneumonia and infection control /E.Alp, A.Voss// *Ann.Clin.Microbiol. Antimicrob.* — 2006. — №5. — P. 1–11.

4. Tronel H. Overview of diagnostic and detection methods for legionellosis and *Legionella* spp. / H. Tronel, P. Hartmann // *Lett. Appl. Microbiol.* — 2009. — №48. — P. 653–656.
5. Fraser D. Legionnaires' diseases. Description of an epidemic of pneumonia / D.W. Fraser, T.R. Tsai, W. Orenstein // *N. Engl. J. Med.* — 1977. — №297. — P. 1189–1197.
6. Multicenter comparison of molecular methods for detection of *Legionella* spp. in spurious samples / M. Bencini, A. Van den Brule, E. Claas [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* — 2007. — №45. — P. 3390–3392.
7. Integrated real-time PCR for detection and monitoring of *Legionella pneumophila* in water systems / D. Yaradou, S. Hallier-Soulier, S. Moreau, [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2007. — №73. — P. 1452–1456.
8. Diederer B. *Legionella* spp. and Legionnaires' disease / B. Diederer // *J. Infect.* — 2008. — № 56. — P. 1–12.
9. Legionnaires' disease in immunocompromised patients: A case report of *Legionella longbeachae* pneumonia and review of the literature / P. Kumpers, A. Tide, P. Kirschner [et al.] // *J. Med. Microbiol.* — 2008. — №57. — P. 384–387.
10. Выявление бактерий *Legionella pneumophila* в объектах окружающей среды. — (Методические указания) / Г.Ф. Лазикова, Ю.М. Федоров, И.В. Брагина [и др.]: МУК 4.2.2217-07. М. — 2007. — 24 с.
11. Rapid method for enumeration of viable *Legionella pneumophila* and other *Legionella* spp. in water / P. Delgado-Viscogliosi, T. Simonart, V. Parent [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2005. — №71. — P. 4086–4096.
12. The rapid and specific real-time detection of *Legionella pneumophila* in water samples using Optical Waveguide Lightmode Spectroscopy / I. Cooper, S. Meikle, G. Standen [et al.] // *J. Microbiol. Methods.* — 2009. — №78. — P. 40–44.
13. International Standards Organisation / Water quality- detection and enumeration of *Legionella* // International standard ISO 11731. — 1998. — Geneva, Switzerland.
14. Association Française de Normalisation. Water quality. Detection and enumeration of *Legionella* spp. and *Legionella pneumophila*. Method by direct inoculation and after concentration by membrane filtration of centrifugation / AFNOR // NF T90–431. — 2003. — La Plaine Saint-Denis, France.
15. Specific real-time PCR for simultaneous detection and identification of *Legionella pneumophila* serogroup 1 in water and clinical samples / N. Merault, C. Rusniok, S. Jarraud [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2011. — №77. — P. 1708–1717.
16. Evaluation of a *Legionella* urinary antigen enzyme immunoassay for rapid detection of *Legionella pneumophila* in water samples / S. Blanco, C. Prat, M. Sanchez [et al.] // *Int. J. Hyg. Environ. Health.* — 2008. — №211. — P. 168–171.
17. Studies on the efficacy of Chloramine T trihydrate (N-chloro-p-toluene sulfonamide) against planktonic and sessile populations of different *Legionella pneumophila* strains / N. Ozlem Samli-Yurudu, A. Kimiran-Erdem, A. Cotuk [et al.] // *Int. J. Hyg. Environ. Health.* — 2007. — № 210. — P. 147–153.
18. Incubation of water samples containing amoebae improves detection of *Legionellae* by the culture method / G. Sanden, W. Morrill, B. Fields [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* — 1992. — № 58. — P. 2001–2004.
19. Bartie C. Identification methods for *Legionella* from environmental samples / C. Bartie, S. Venter, L. Nel // *Water Res.* — 2003. — №37. — P. 1362–1370.
20. Murray P. *Legionella*. / P. Murray, K. Rosenthal, M. Pfaller (eds.) // *In.: Medical Microbiology.* — 2005. — 5th edn. — Elsevier Science. — P. 391–340.
21. Murdoch D. Diagnosis of *Legionella* infection. / D. Murdoch // *Clin. Infect. Dis.* — 2003. — №36. — P. 64–69.
22. Edelstein P. *Legionella* species and Legionnaires' disease / P. Edelstein, N. Cianciotto // *Prokaryotes.* — 2006. — № 6. — P. 988–1033.
23. *Legionella* and the prevention of legionellosis / J. Bartram, Y. Chartier, J. Lee [et al.] // World Health Organization (WHO). — Geneva. SBN: 9241562978.
24. Novel PCR-probe assay for detection of and discrimination between *Legionella pneumophila* and other *Legionella* species in clinical samples / A. van der Zee, H. Verbakel, C. De Jong [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* — 2002. — № 40. — P. 1124–1125.
25. Detection of *Legionella* spp. in natural and man-made water systems using standard guidelines / A. Borges, M. Simoes, A. Martinez-Murcia [et al.] // *J. Microbiol. Res.* — 2012. — № 2 (4). — P. 95–102.

О выявлении и идентификации штаммов Legionella pneumophila в воде

С.М. Кузьминский

*Научный центр превентивной токсикологии, пищевой и химической безопасности
имени академика Л.И. Медведя МЗ Украины, г. Киев*

Резюме. Цель публикации — аналитический обзор литературы и определение путей для преодоления существующих проблем. Инфекции, обусловленные Legionella spp., в последнее время рассматриваются как растущая угроза для здравоохранения, связанная с высокой заболеваемостью и летальностью. В соответствии со стандартом ИСО только те колонии, которые растут на БУД-агаре и не растут на кровяном агаре считают подозрительными на принадлежность к роду Legionella. Окончательная идентификация возможна лишь с помощью PCR-метода. Но культуральный метод имеет ряд ограничений, которые делают его недостаточно пригодным для оперативных противоэпидемических мероприятий. Для мониторинга безопасности воды и профилактики легионеллеза необходима разработка новых методов, которые бы сочетали специфичность выявления легионелл с возможностью различения жизнеспособных и нежизнеспособных микробных клеток.

Ключевые слова: Legionella pneumophila, вода, идентификация, ПЦР-метод.

For the detection and identification of strains Legionella pneumophila in water

S. Kuzminskiy

*«L.I. Medved's Research Center of Preventive Toxicology, Food and Chemical Safety, Ministry of Health,
Ukraine (State Enterprise)», Kyiv*

Summary. The aim of this article — an analytical literature review in order to solve of the problems exist. Infections caused by Legionella spp. are considered at the present time, an emerging public health problem and are linked to high rates of mortality and morbidity. According to the procedure recommended by ISO-standard, only the colonies which grew in BCYE agar and not on blood agar were considered as suspected Legionella strains. Final identification may be made by the use of PCR-techniques. But culture method have several limitations that makes it inappropriate for preventions actions and rapid response in emergency situations. Development of new assays that combine both specific detection and viability criteria is essential for monitoring water safety and legionellosis prevention.

Key words: Legionella pneumophila, water, identification, PCR-method.

Надійшла до редакції 15.04.2014