

УДК 637:616.98:579.869.1

UDC 637:616.98:579.869.1

УСКОРЕННАЯ ИНДИКАЦИЯ LEGIONELLA PNEUMOPHILA НА ОСНОВЕ ПЦР-РТ

ACCELERATED INDICATION OF LEGIONELLA PNEUMOPHILA ON THE BASIS OF PCR-RT

Бровкина Анна Николаевна
к.в.н., докторант
*Государственное научное учреждение
Всероссийский научно-исследовательский
институт ветеринарной санитарии, гигиены и
экологии РАСХН, Москва, Россия*

Brovkina Anna Nikolaevna
Cand. Vet.Sci., competitor for doctor's degree
*The state scientific institute the All-Russia scientific
research institute of veterinary sanitary, hygiene and
ecology, The Russian academy of agricultural
sciences, Moscow, Russia*

Проведены мониторинговые исследования объектов внешней среды по индикации Legionella pneumophila с использованием метода ПЦР в реальном времени

Monitoring researches of objects of an environment of indication Legionella pneumophila with use of method of PCR-RT are carried out

Ключевые слова: LEGIONELLA PNEUMOPHILA, СКРИНИНГ, ОБЪЕКТЫ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ, ИНДИКАЦИЯ, МЕТОД ПЦР-РТ

Keywords: LEGIONELLA PNEUMOPHILA, SCREENING, OBJECTS OF AN ENVIRONMENT, INDICATION, METHOD OF PCR-RT

Легионеллы – грамотрицательные аэробные подвижные бактерии. В настоящее время известно более 40 видов легионелл, 22 из которых патогенны для человека. Чаще всего причиной заболевания является Legionella pneumophila (в 90% случаев).

Местом естественного обитания легионелл служат пресноводные водоемы, где они формируют биоценоотические ассоциации, и почва.

Инфекции, вызванные легионеллами - это острые респираторные инфекции, возбудители которых относятся к роду Legionella семейства Legionellaceae. В настоящее время семейство Legionellaceae насчитывает 41 вид (63 серогруппы). Типичным представителями рода является Legionella pneumophila, являющаяся возбудителем болезни в 80 – 90% случаев. Пневмония, вызываемая этим микроорганизмом, носит название болезни «легионеров» и служит прототипом всех инфекций, вызываемых представителями этой группы. В совокупности эти инфекции часто относят к легионеллезам.

Впервые заболевание, вызванное легионеллами, описано в 1976 году в Филадельфии. При проведении исследований было обнаружено, что

инфекционным агентом оказалась ранее неизвестная грамотрицательная бактерия, получившая название *Legionella pneumophila*.

Антигенный состав легионелл сложен; выделяют тип- и группоспецифические антигены. Факторами патогенности являются: токсин пептидной природы. Имеются данные о способности легионелл образовывать термостабильные экзотоксины (цитотоксины и гемолизины) и эндотоксин (образующийся в высокой концентрации).

Легионеллы составляют часть микробной флоры многих естественных и искусственных водных экологических систем. Накоплению легионелл благоприятствуют: температура 25-42°C, застой воды, образование накипей и осадков, а также присутствие организмов-симбионтов - водорослей, простейших (амеб, инфузорий), других бактерий.

Источником инфекции могут быть также системы распределения питьевой воды. Бактерии активно колонизируют душевые установки, ванны комнаты для бальнеопроцедур, плавательные бассейны, компрессорные устройства, оросительные системы, фонтаны и др.

Групповые вспышки возможны при проживании вблизи открытых водоемов, посещении бассейнов, использовании кондиционеров, гидромассажных установок и увлажнителей воздуха. Фактором распространения инфекции может служить система принудительной вентиляции. Легионеллы активно колонизируют синтетические и резиновые поверхности промышленного, водопроводного, медицинского оборудования с образованием биопленок, в которых бактерии значительно более устойчивы к действию дезинфицирующих веществ.

Легионеллы распространены в окружающей среде, где длительно сохраняются (в воде – до 300 дней). Чувствительны к фенолу, формалину, этиловому спирту, высокой температуре.

Механизм передачи – аэрозольный, чаще всего заражение происходит при вдыхании мелкодисперсного водного аэрозоля. Возможен воздушно-пылевой (почвенный) и алиментарный (с питьевой водой) путь заражения. Естественная восприимчивость людей высокая (1, 5).

Более 30 % случаев спорадического легионеллеза, многочисленные эпидемические вспышки в гостиницах, на круизных судах послужили причиной создания международной системы эпидемиологического надзора за случаями легионеллеза, связанного с поездками.

Исследования, проведенные Центром по контролю заболеваемости (США, Огайо, 2004), показали, что диагностируется лишь 3% спорадических случаев болезни. Большая частота встречаемости по сравнению с диагностируемыми случаями связана с возможностями лабораторного подтверждения диагноза.

Классический бактериологический метод длителен, так как бактерии чрезвычайно требовательны к условиям культивирования и растут медленно. Метод иммунофлуоресцентного окрашивания быстр и специфичен, но имеет довольно низкую чувствительность. При постановке серологических реакций отмечаются перекрестные реакции с антителами к некоторым грамотрицательным палочкам (1,5). Разработка чувствительных и специфичных экспресс-методов индикации патогенных микроорганизмов в продуктах питания и объектах окружающей среды остается актуальной и одной из важнейших задач.

Легионеллез распространен повсеместно. Многочисленные случаи заболевания послужили основой для создания единой международной системы эпидемиологического контроля за случаями легионеллеза. Перспективным, а также обладающим высокой специфичностью и чувствительность методом диагностики *Legionella pneumophila* является метод ПЦР в реальном времени.

Цель работы

Проведение исследований по ускоренной индикации *Legionella pneumophila* при проведении мониторинговых исследований объектов окружающей среды с использованием метода ПЦР-РТ с автоматической экстракцией нуклеиновых кислот.

Материалы и методы

Исследовали образцы внешней среды: пробы из открытых водоемов, смывы с кондиционеров, душевых установок.

На присутствие бактерий *Legionella pneumophila* исследовано: 118 смывов из кондиционеров, 120 смывов с душевых установок, 70 проб воды открытых водоемов.

Смывы с кондиционеров и душевых установок ресуспендировали в стерильном физиологическом растворе, суспензию подвергали высокоскоростному центрифугированию (12000 g, 10 минут), 50 мкл осадка использовали для выделения ДНК.

Пробы воды открытых водоемов концентрировали фильтрованием через мембранные фильтры (диаметр пор 0,45 мкм), осадок с фильтра ресуспендировали в 1,5 мл физиологического раствора, подвергали высокоскоростному центрифугированию (12000 g, 10 минут), для выделения ДНК использовали 50 мкл осадка.

Выделение ДНК из исследуемых образцов проводили с помощью классического метода экстракции нуклеиновых кислот комплектом «ДНК-сорб В», производства ФГУН «ЦНИИЭ» Роспотребнадзора, а также с помощью автоматической станцию «NucliSENS® easyMAG™» («BioMérieux», Франция) с проведением лизиса как вне прибора, так и в приборе (рисунок 1).



Рис. 1. Автоматическая станция для экстракции нуклеиновых кислот «NucliSENS® easyMAG™»

При проведении лизиса вне прибора инкубировали пробу с лизирующим буфером в течение 30 минут при комнатной температуре с постоянным перемешиванием. Затем, вносили сорбент и дальнейшее выделение происходило в автоматическом режиме. При проведении лизиса в приборе процедура лизиса занимала 20 минут с дальнейшими автоматическим выделением. Схема выделения представлена на рисунке 2.

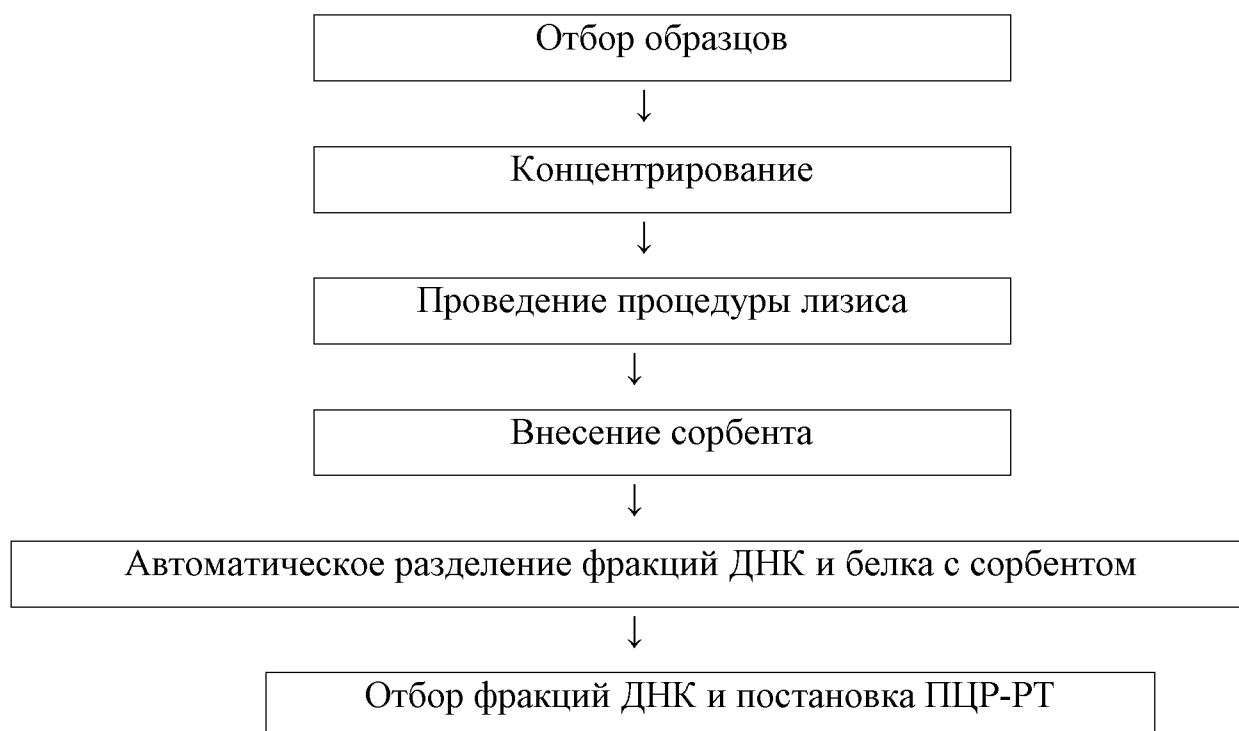


Рис. 2. Схема автоматического выделения нуклеиновых кислот.

Для постановки реакции амплификации использовали 10 мкл ДНК-проб.

Индикацию легионелл проводили на приборе «Rotor Gene 6000» (производства «Corbett Research», Австралия). Для амплификации использовали набора реагентов для выявления ДНК *Legionella pneumophila* в биологическом материале и объектах окружающей среды методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Legionella pneumophila*-FL» вариант FRT производства ФГУН «ЦНИИЭ» Роспотребнадзора.

Результаты исследований

Проводили количественный учет результатов реакции с одновременным учетом всех контрольных реакций.

Учет результатов амплификации проводили только в том случае, если значение коэффициента корреляции R^2 составляло не менее 0.97, а показатель эффективности амплификации находился в пределах 0,85 – 1.15. Расчет концентрации ДНК *Legionella pneumophila* в 1 л воды ($C_{\text{ДНК } L_p}$ (копий/л)) проводили вручную или с использованием программного обеспечения, прилагающегося к комплекту реагентов, по следующей формуле:

$$C_{\text{ДНК } L_p} \text{ (копий / л)} = K_{\text{ДНК } L_p} / K_{\text{ВКО-STI-338}} * C_{\text{ВКО-STI-338}} * 2, \text{ где}$$

$K_{\text{ДНК } L_p}$ (копий / мл) = Расчетное количество копий ДНК *Legionella pneumophila* в 1 мл тестируемой пробы,

$K_{\text{ВКО-STI-338}}$ (копий / мл) = Расчетное количество копий ДНК ВКО-STI-338 в 1 мл внутреннего контрольного образца в тестируемой пробе,

$C_{\text{ВКО-STI-338}}$ (копий / мл) = Количество копий ДНК ВКО-STI-338 в 1 мл внутреннего контрольного образца (значение указано во вкладыше к набору реагентов),

2 – коэффициент пересчёта.

Результаты исследований на наличие ДНК бактерий Legionella pneumophila приведены в таблице 1.

Таблица 1.

Результаты исследований на наличие ДНК бактерий Legionella pneumophila

Объекты исследований	Выделение с помощью автоматической станции «NucliSENS® easyMAG™», лизис в приборе			Выделение с помощью автоматической станции «NucliSENS® easyMAG™», лизис вне прибора			Выделение с помощью комплекта реагентов «ДНК-сорб В»		
	результаты	коэффициент корреляции (R ²)	эффективности амплификации	результаты	коэффициент корреляции (R ²)	эффективности амплификации	результаты	коэффициент корреляции (R ²)	эффективности амплификации
Смывы с кондиционеров и душевых установок	н/о	~0,98	0,90 – 0,93	н/о	~0,96	0,97 - 1,12	н/о	~0,95	0,85 – 0,95
Пробы воды открытых водоемов	н/о	~0,97	0,88 – 0,90	н/о	~0,97	0,98 - 1,15	н/о	~0,96	0,85 – 0,95

- Всего исследовано 308 образцов.

На рисунке 3 показана кинетика реакции ПЦР-РТ при индикации легионелл.

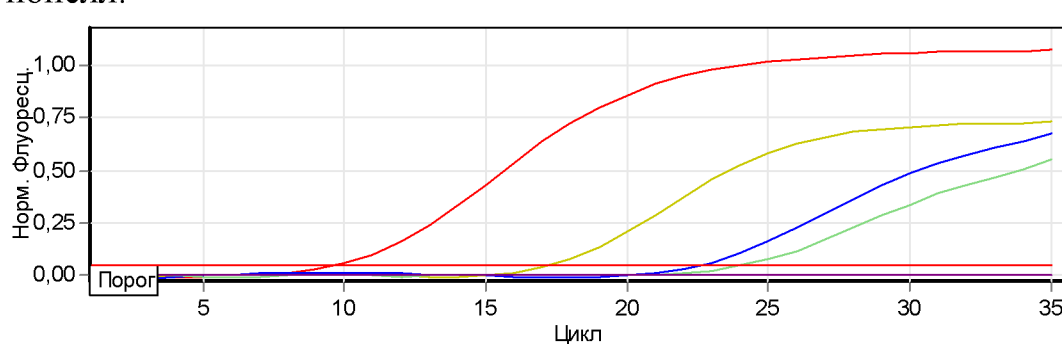


Рис. 3. Кривые амплификации при исследовании образцов на присутствие Legionella pneumophila

При проведении анализа положительных образцов не выявлено.

Соотношение значений коэффициента корреляции и показателя эффективности амплификации было оптимальным при проведении процедуры лизиса вне прибора. При проведении классической («ручной») экстракции нуклеиновых кислот в двух случаях были получены сомнительные результаты, которые в дальнейшем при повторном исследовании данных образцов как методом ПЦР, так и бактериологическим методом – не подтвердились.

Список использованной литературы:

1. Борисов Л.Б., Смирнова А.М., /Медицинская микробиология, вирусология, иммунология// М., Медицина, 1994.
2. Калашникова Т.В., Мусабаев Э.И., Ковтуненко Н.Г. и др./Разработка и внедрение управления качеством лабораторных исследований//Сборник трудов 6-ой Всероссийской научно-практической конференции «Молекулярная диагностика», М., 2007.- Том 1.- С.48-52.
3. Черкасский Б.В. /Инфекционные и паразитарные болезни// М., ИД «Медицинская газета».-1994.
4. ISO 1998.ISO 11731:1998 Water Quality- detection and enumeration of *Legionella*.
5. *Legionella* and the prevention of Legionellosis. - WHO guidelines. - 2006.