



# ЛЕГИОНЕЛЛЕЗ



**ЛЕГИОНЕЛЛЕЗ** (болезнь легионеров, питтсбургская пневмония, понтиакская лихорадка, легионелла-инфекция, лихорадка Форт-Брагг) - сапронозная бактериальная острая инфекционная болезнь с аспирационным механизмом передачи возбудителя, обусловленная различными видами микроорганизмов, относящихся к роду *Legionella*. В тяжелых случаях характеризуется лихорадкой, пневмонией, поражением пищеварительного тракта, почек и ЦНС.

1976 г. - конгресс ветеранов  
«Американского легиона»,  
Филадельфия (США), присутство-  
вали более 4000 человек

- 221 человек заболели
- 34 летальных случая



С. Шепард и Дж. Мак-Дейд впервые выделили грамотрицательную палочку, отнесенную к роду *Legionella*, в 1977 году. Хотя вспышки подобной инфекции наблюдались и ранее, выделенный возбудитель назван *Legionella pneumophilla*.



Подтип протеобактерий

- семейство *Legionellaceae*

- род *Legionella*

Известны около 50 видов легионелл,

22 вида играют роль в инфекционной патологии человека, более 95 % случаев легионеллеза ассоциированы с видом *L. pneumophila*.

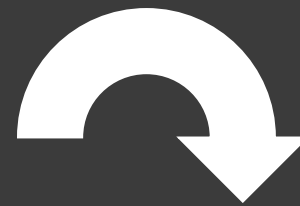
Вид *L. pneumophila* включает 16 серогрупп,

9 других видов легионелл – по 2 серогруппы, остальные – по одной.

Другие виды легионелл вызывают развитие патологического процесса при нарушениях клеточного иммунитета.

- *L. pneumophila* > 95 % случаев легионеллеза

- *L. micdadei*
- *L. longbeachae*
- *L. dumoffii*
- *L. bozemanii*



при  
нарушениях  
клеточного  
иммунитета

# *LEGIONELLA*

- грамотрицательные палочки диаметром 0,5-0,7 мкм и длиной 2-5 мкм, в ряде случаев встречаются формы длиной до 20-25 мкм
- не образуют эндоспор, микроцист и капсул
- аэробы
- большинство видов подвижны за счет одного, двух или большего числа жгутиков
- присутствует липидная вакуоль
- паразитируют на амебах



- обладают слабой биохимической активностью, разжижают желатину, не образуют уреазу, не восстанавливают нитраты, продуцируют каталазу, результаты оксидазного теста могут варьировать
- исключительно требовательны к pH питательных сред, который должен составлять 6,95
- не растут на обычных питательных средах, что связано с потребностью возбудителя в L-цистеине и ионах железа



- для выделения и культивирования легионелл используют различные модификации буферного угольно-дрожжевого агара, содержащего L-цистеин, растворимый пирофосфат железа и  $\alpha$ -кетоглутаровую кислоту, культивирование их представляет длительный трудоемкий процесс
- оптимальная температура -  $35^{\circ}\text{C}$ , но размножение может происходить в условиях от  $25^{\circ}\text{C}$  до  $45^{\circ}\text{C}$
- не переносят высушивания и нагревания выше  $65^{\circ}\text{C}$



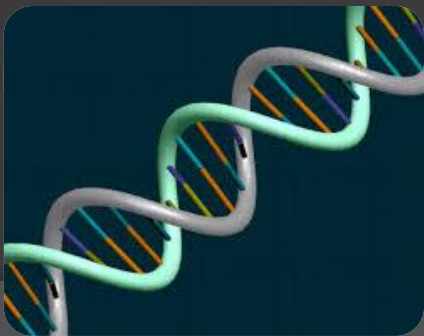
# ТЕМПЕРАТУРНАЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ LEGIONELLA



- концентрация свободного хлора в воде в количестве 0,5-1,0 мг/л является губительной для свободноживущих легионелл
- в искусственных водных системах эти бактерии могут накапливаться в высокой концентрации в биопленках, где практически полностью утрачивают чувствительность к указанной концентрации свободного хлора
- в целях дезинфекции систем водоснабжения применяют повышенные концентрации хлорсодержащих дезинфектантов (1-3 мг/л свободного хлора)
- отличаются устойчивостью к пенициллину и другим бета-лактамам, а также аминогликозидам.

# ГЕНОМ ЛЕГИОНЕЛЛ

- характеризуется высокой вариабельностью
- содержание ГЦ пар составляет от 38 до 40 %, размер единственной хромосомы у разных штаммов *L. pneumophila* может варьироваться от 3346 до 3503 т.п.н.
- среди генов, детерминирующих факторы вирулентности легионелл, наиболее изучены к настоящему времени:
  - ген *mir* (кодирует синтез полипептида Mir размером 24 кДа, участвующего во взаимодействии легионелл с макрофагами),
  - ген *htpB* (белок теплового шока Hsp60),
  - ген *omp28* (кодирует синтез полипептида МОМР размером 25 кДа, одного из компонентов клеточной стенки легионелл)



# ФАКТОРЫ ПАТОГЕННОСТИ ЛЕГИОНЕЛЛ

- два низкомолекулярных токсина
- цитолизин-белок (Zn-металлопротеаза)
- ферменты: фосфолипаза, протеинкиназа и кислая фосфотаза
- поверхностный белок por
- другие белки и ЛПС

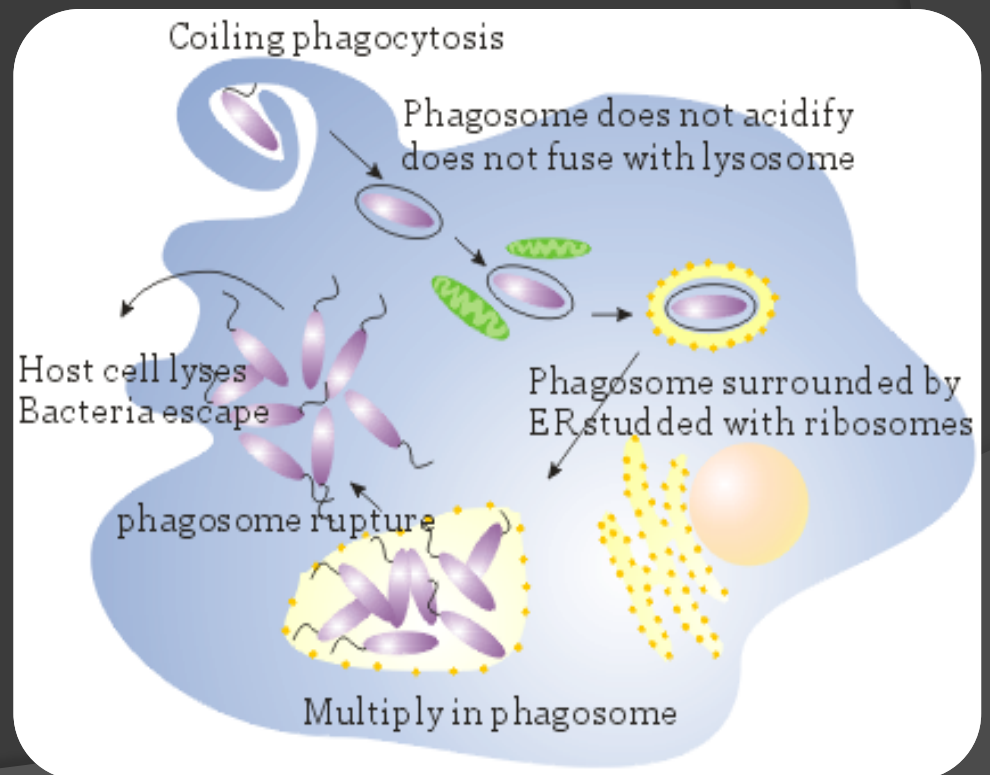
Таблица 3.22. Факторы вирулентности *Legionella pneumophila*

Состояние и факторы вирулентности	Биологический эффект
Факультативный внутриклеточный паразитизм	Поражение альвеолярных макрофагов и моноцитов; ингибирование фаголизосомального слияния при фагоцитозе
Главный белок наружной мембраны (порин)	Видоспецифический белок, необходимый для связывания C3-рецепторов макрофага, обладает иммуногенными свойствами
Цитолизин, или главный секреторный белок	Zn-металлопротеаза с цитотоксической и гемолитической активностью
Липополисахарид	Эндотоксин
Главный белок цитоплазматической мембраны	Белок теплового шока
Легиолизин	Гемолизин, образующий коричневый пигмент на тирозин содержащей среде
Протеолитические ферменты: фосфатаза, липаза, нуклеаза	Разрушение клеток хозяина
Возможность нахождения и размножения в амебах	Длительное сохранение во внешней среде

# ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ЛЕГИОНЕЛЛ С ФАГОЦИТИРУЮЩЕЙ КЛЕТКОЙ ПРОИСХОДИТ В НЕСКОЛЬКО ЭТАПОВ:

- контакт возбудителя с рецепторами поверхности эукариотической клетки
- фагоцитоз инициируется специфическими лигандами между поверхностью бактерий и соответствующими рецепторами эукариотической клетки
- проникновение в фагоцит и включение механизмов, ингибирующих бактерицидное действие фагосомы

- образование «репликативной вакуоли»
- внутриклеточное размножение возбудителя, приводящее к гибели фагоцита.

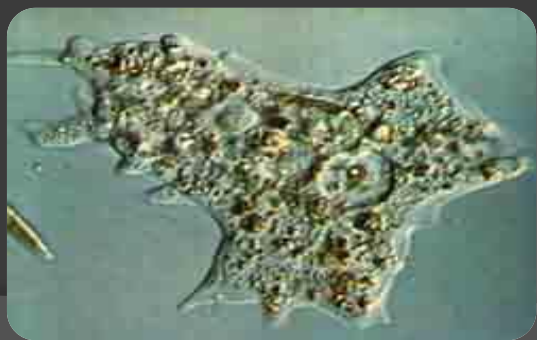




# ЭПИДЕМИОЛОГИЯ

## Среда обитания

- застойная некипяченая вода природных водохранилищ. В своей естественной водной среде обитания *Legionella* не является источником инфекций, а составляет часть микробной флоры многих естественных водных экосистем и почвы. Обнаруживаются как симбионты сине-зеленых водорослей или паразиты некоторых организмов.





- искусственные сооружения  
(резервуары, водные  
установки, водонагреватели,  
системы отопления и  
кондиционирования воздуха)



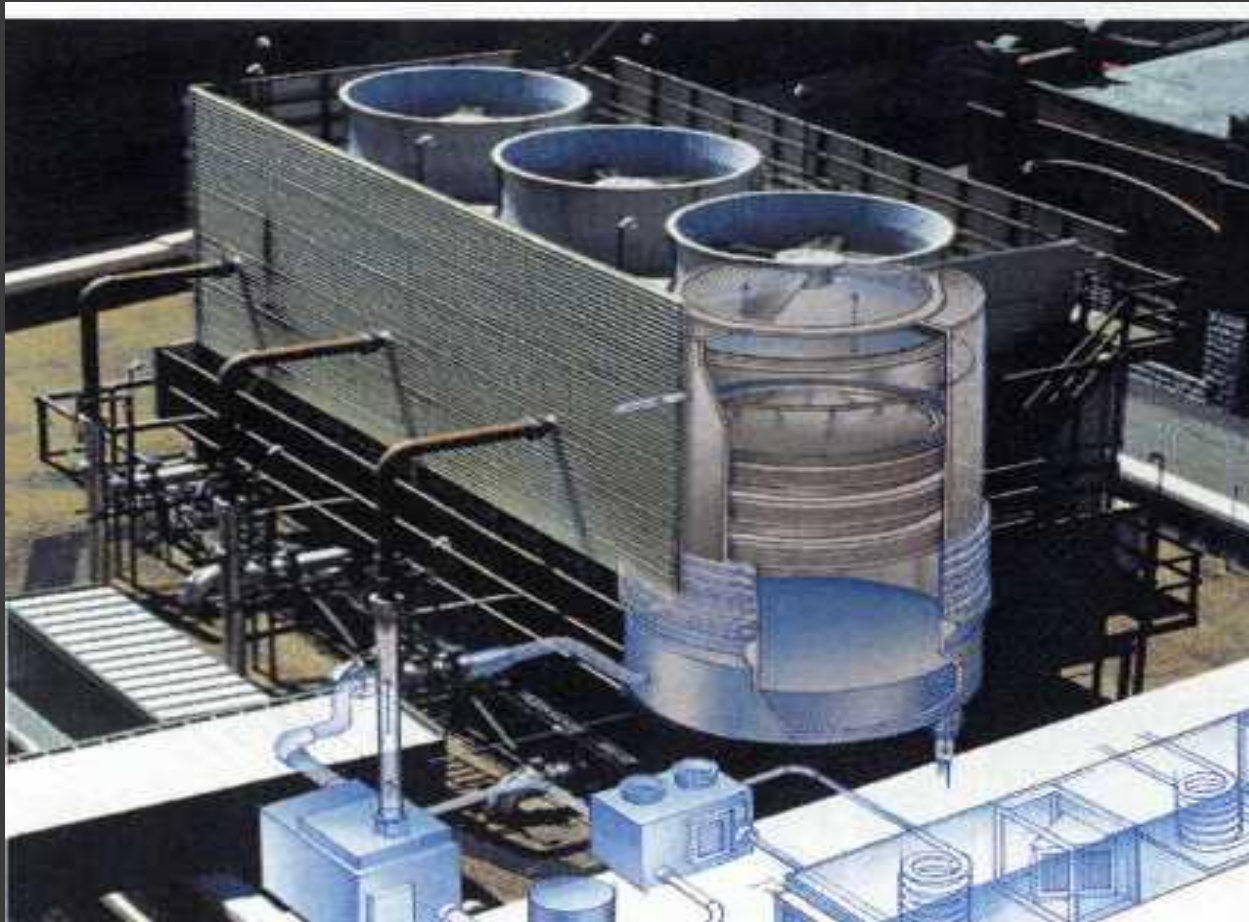
# ИСТОЧНИКИ ИНФИЦИРОВАНИЯ *LEGIONELLA* ДЛЯ ЧЕЛОВЕКА

- Системы охлаждения и кондиционирования
- Градирни
- Компрессорные устройства
- Бассейны, аквапарки, SPA-залы, джакузи, фонтаны
- Стоматологическое и другое медицинское оборудование





# КОЛОНИЗАЦИЯ ЛЕГИОНЕЛЛАМИ ИСКУССТВЕННЫХ ВОДНЫХ СИСТЕМ



# МЕХАНИЗМЫ ПЕРЕДАЧИ ВОЗБУДИТЕЛЯ

Воздушно-капельный - при функционировании водных систем охлаждения (образование мелкодисперсного аэрозоля). Зона распространения аэрозоля - **очаг инфекции**.

Имеются подтверждения, что пыль, образующаяся при проведении строительных и земляных работ, может являться причиной заболевания. Однако это не доказано.

Аспирационный или алиментарный (питьевая вода) - для контингентов групп риска. Инфекция не передается от человека человеку.



◎ Основные места заражения. Повсюду, где есть источники воды с условиями для создания аэрозолей:

⇒ отели

⇒ офисы

⇒ школы

⇒ лечебно-профилактические учреждения

⇒ ..... повсюду

◎ Основные факторы передачи:

⇒ мелкодисперсный аэрозоль

⇒ вода, циркулирующая в системах водоснабжения и кондиционирования

На сегодняшний день большее количество случаев легионеллеза обнаруживается в США и странах Европы.

В России в 2003-2004 гг. зафиксированы 18 случаев легионеллеза, в 2005 - 26. Наблюдениями доказано, что частота заболеваемости у путешественников несколько выше, чем у людей, не меняющих своего местонахождения.

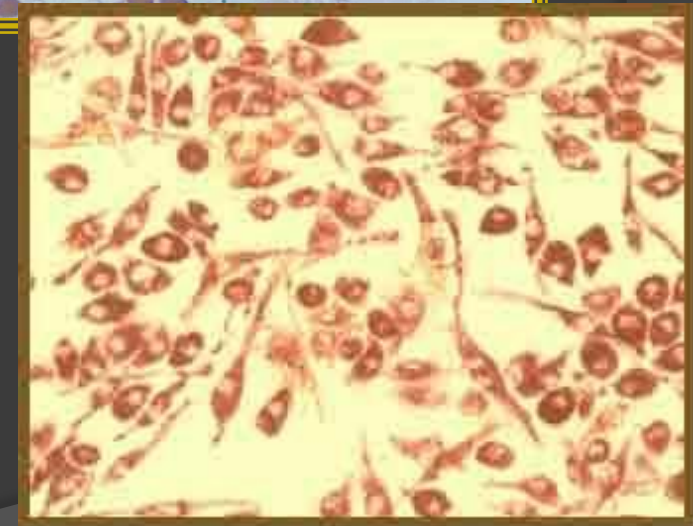
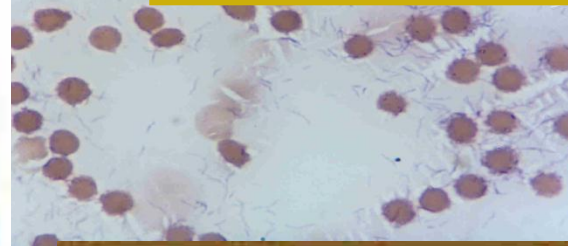
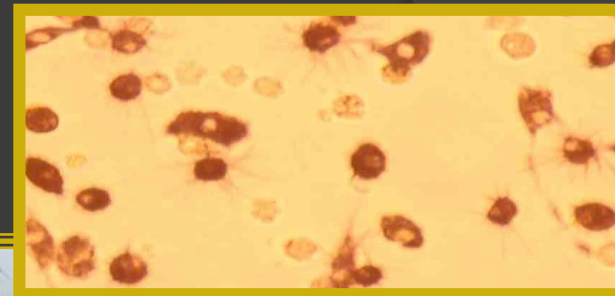
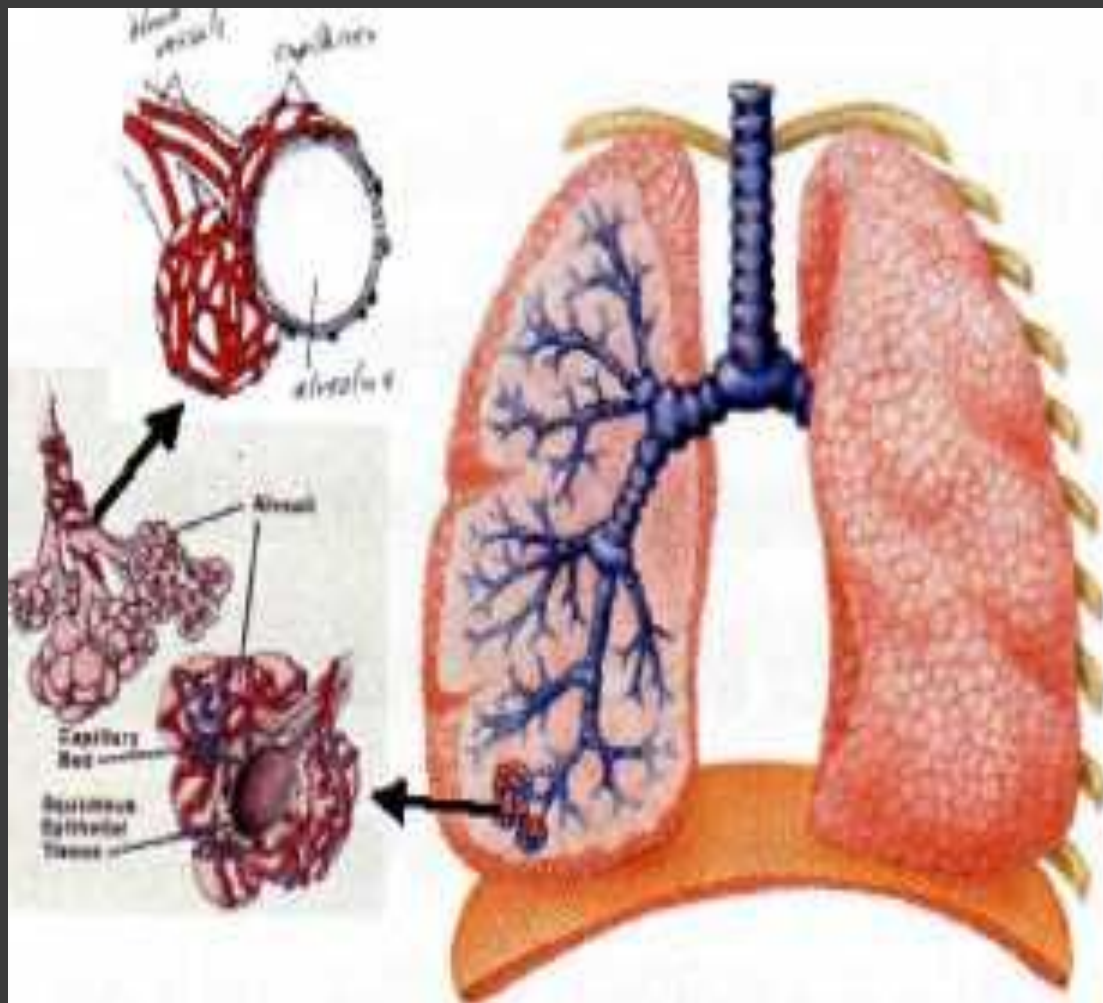
В 83 % всех случаев заражения путешественники останавливались в отелях, в 10 % - в кемпингах, а в 7 % - находились на пассажирских судах.

# Патогенез инфекции

- Ворота инфекции – слизистая оболочка респираторного тракта
- Проникновение возбудителя в легочную ткань - прикрепление к альвеолярным макрофагам и размножение свободно в кислой среде
- Патологические изменения охватывают не менее одной доли легкого и протекают в виде сливной пневмонии



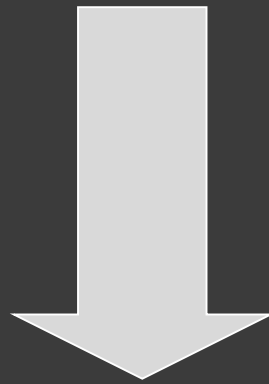
# КОЛОНИЗАЦИЯ ЛЕГИОНЕЛЛАМИ ОРГАНИЗМА ЧЕЛОВЕКА



# КЛИНИЧЕСКИЕ ФОРМЫ ЛЕГИОНЕЛЛЕЗА



Лихорадка  
Понтиак  
(ОРЗ)



Болезнь  
легионеров  
(пневмония)



Лихорадка  
Форт-Брагг  
(лихорадочная  
инфекция с  
экзантемой)

**Болезнь легионеров** - инкубационный период 2-10 дней, протекает с развитием пневмонии,. В тяжелых случаях больные погибают от нарастающей дыхательной недостаточностью.

**Понтиакская лихорадка** - инкубационный период от 5 ч. до 3 сут., протекает по типу острого трахеобронхита без очаговой лёгочной симптоматики. Течение благоприятное. Летальных исходов не наблюдается.

**Лихорадка «Форт-Брагг»** - инкубация длится от нескольких часов до 10 сут. Лихорадка до 38-38,5°C, озноб, головная боль, полиморфная сыпь. Длительность болезни 3-7 дней. Течение благоприятное.

# ПРОФИЛАКТИКА

Проведение карантинных мероприятий нецелесообразно.  
Специфическая профилактика с использованием вакцин - в стадии разработки.

Неспецифическая профилактика - снижение количества возбудителей в водных системах:

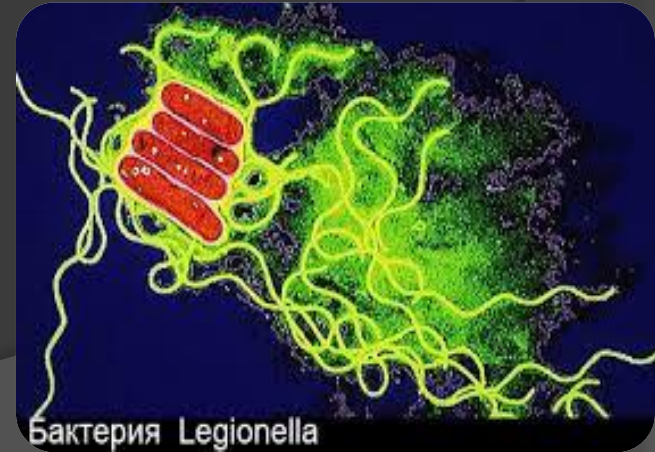
- грамотная инженерно-техническая эксплуатация водных систем
- периодическая механическая очистка водных систем
- подъем температуры воды эксплуатируемых объектов выше 60 градусов
- минимизация резких переходов температуры и давления в водных системах
- обеззараживание воды
- использование медных труб



# ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

## Методы исследований:

- Бактериологический
- Бактериоскопический
- Иммунологические
- Молекулярно-генетические
- Биологический



Бактерия Legionella

Бактерия Legionella

# МАТЕРИАЛ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ:

- плевральная жидкость,
- мокрота,
- содержимое абсцессов,
- сыворотка,
- спинномозговая и внутрисуставная жидкости,
- СМЫВЫ НОСОГЛОТКИ,
- секционный материал,
- объекты окружающей среды: вод, смывы, соскобы биопленок, влажная почва, простейшие.



# ИССЛЕДОВАНИЕ КЛИНИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

- Для бактериологического анализа (забор материала до начала антибиотикотерапии)

Объем пробы клинического материала - не менее 1 мл. Транспортировка в течение 48 ч. при температуре 6-24 °С. Образцы центрифугируют при 10000 об./мин. 15 мин., супернатант удаляют, оставляя в пробирке 0,5-1 мл жидкости, в которой ресуспендируют осадок.

Подготовленные пробы высевают по 0,1 мл на среды. Если исследуемый материал содержит большое количество посторонней микрофлоры, применяют тепловую обработку на водяной бане при температуре 50 °С в течение 30 мин.



- Для исследования методом ПЦР

Транспортирование материала при температуре  $6^{\circ}\text{C}$  в течение 6 ч., в замороженном виде – в течение 1 суток.

Возможно использование транспортной среды.

Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала. Недопустимо замораживание образцов цельной крови.

# ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОБ ОБЪЕКТОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

● Для бактериологического анализа берут:

воду (питьевую, из открытых водоемов и др.) - не менее 1 л на одну пробу. С целью дехлорирования - в стерильные флаконы емкостью 500 мл вносят 2 мл 1,5 % раствора гипосульфита натрия;

воду из кранов водопроводных сооружений - после предварительного обжигания их спиртовым факелом и спуска воды в течение 10 мин.;

воду из открытых водоемов - на уровне 10-15 см ниже поверхности;

смывы с объектов - ватным или марлевым тампоном, смоченным стерильным физиологическим раствором и помещают в пробирку с 0,9 % раствором натрия хлорида;

**Соскобы биопленок** с влажной поверхности - сухими тампонами, помещают во флакон; с высохшей поверхности - тампонами, смоченными стерильным физиологическим раствором и помещают в пробирку, содержащую стерильный 0,9 % раствор натрия хлорида.

Доставку проб осуществляют в контейнерах при температуре 6-24 °С. Срок начала исследований от момента отбора проб не должен превышать 48 ч.

Образцы биопленки, смывы с поверхностей подвергают концентрированию с помощью центрифугирования, кислотной и термической обработке.

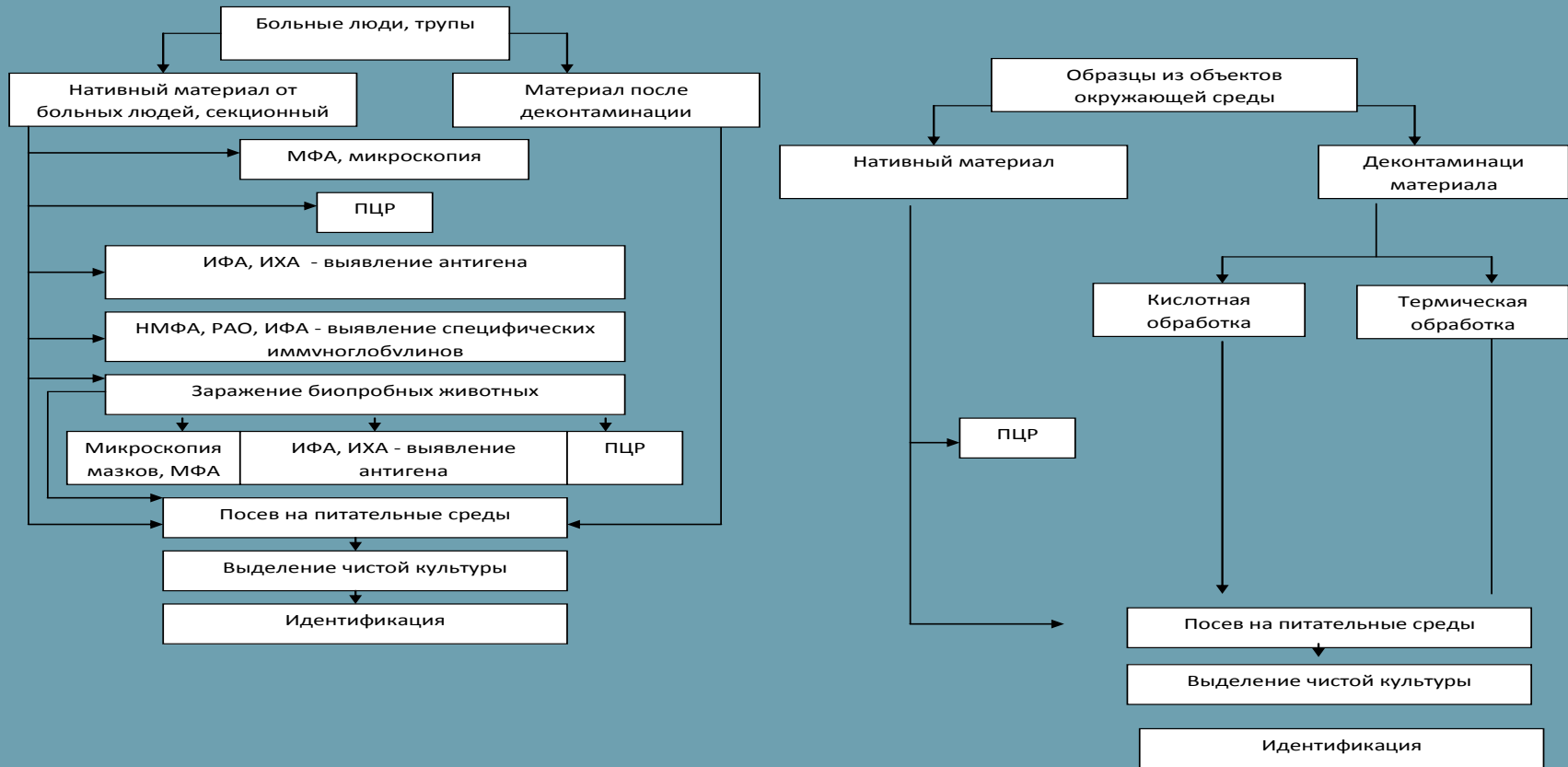
## ● **Для исследования методом ПЦР**

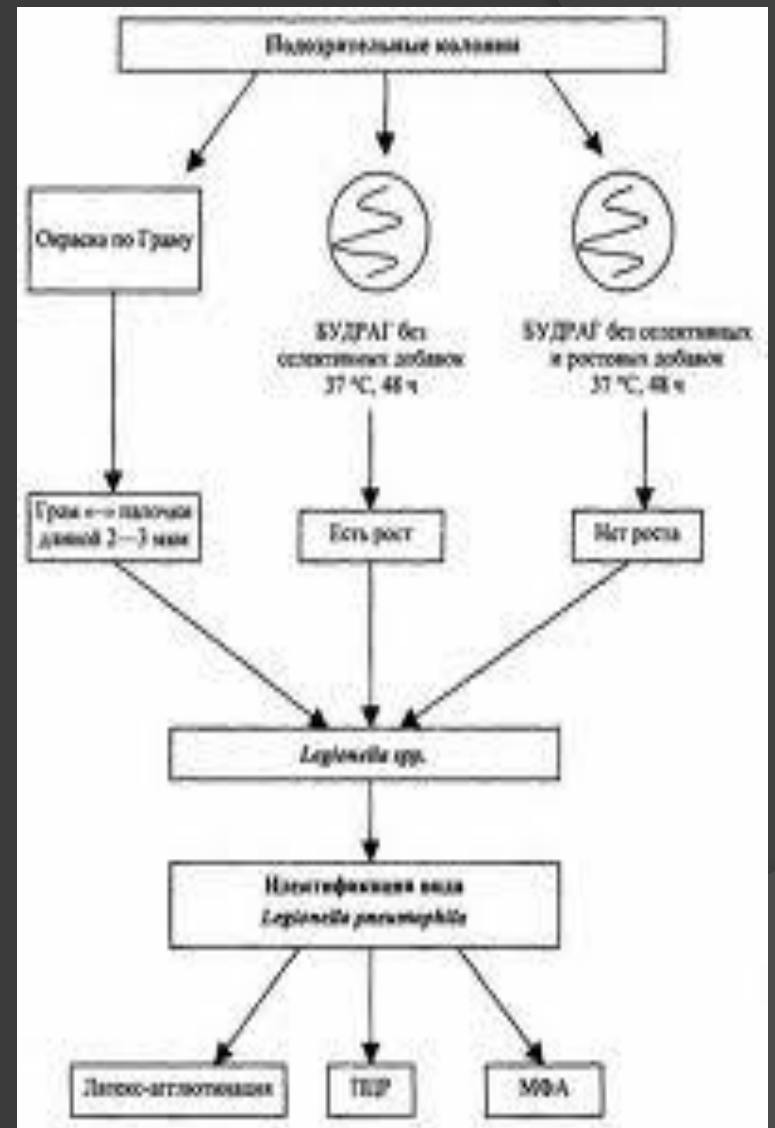
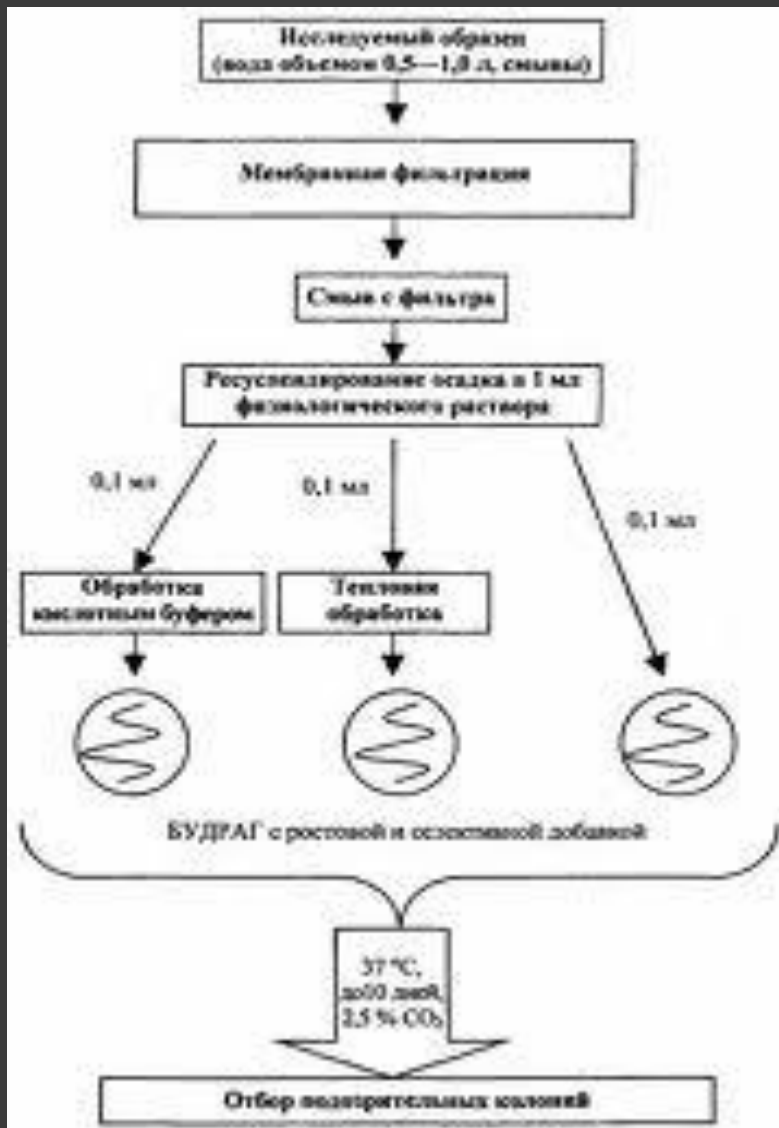
Отбор и предварительная подготовка проб осуществляется таким же образом, как и для бактериологического анализа, исключая этап деконтаминации посторонней микрофлоры.

# ДИАГНОСТИКА ОСНОВАНА НА:

- ⦿ выделение культуры возбудителя
- ⦿ определении уровня специфических антител
- ⦿ определении растворимого антигена легионелл в моче
- ⦿ выявление возбудителя в клиническом материале с помощью иммунофлуоресценции
- ⦿ выявлении возбудителя с помощью ДНК-зондов или ПЦР

# СХЕМА ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ



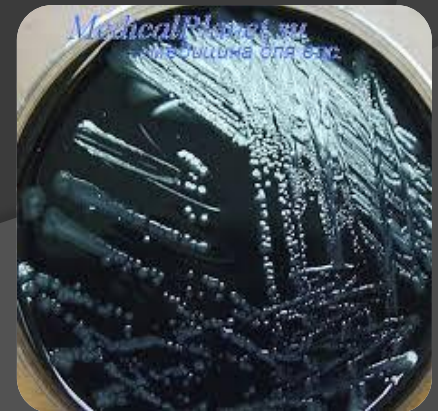


# ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ

- СЭЛ (питательная среда для культивирования и выделения возбудителя легионеллеза), производство Ростовского-на-Дону НИПЧИ;
- Легионеллбакагар (питательная среда для культивирования возбудителя легионеллеза сухая), производство ФГУН ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии г. Оболенск;
- Агар для культивирования легтнелл (производство СтавНИПЧИ);
- Legionella Agar пр-ва Oxoid, BIO-RAD, Biomerieux, Himedia;
- БУДРАГ (буферный угольно-дрожжевой агар).



- Посевы инкубируют во влажной атмосфере при температуре 35 °С , рост некоторых видов стимулирует присутствие 2,5-3 % CO<sub>2</sub> .
- Рост колоний из клинического материала наблюдается не ранее чем через 3-5 сут.
- Максимальное количество видимых колоний обычно вырастает на 8-10 сут.
- Молодые колонии имеют вросший центр, гранулярную или блестящую поверхность.



- ◎ При подозрении на рост легионелл колонии пересевают на среду с ростовыми добавками и на контрольную среду без добавок, не поддерживающую рост легионелл.
- ◎ Рост во втором пассаже на специальной среде при отсутствии роста на контрольной позволяет дать предварительный ответ о наличии в исследуемом материале возбудителя легионеллеза.

# ПОСТАНОВКА БИОЛОГИЧЕСКОЙ ПРОБЫ

- Морских свинок заражают внутрибрюшинно
- Животные заболевают и гибнут на 3-4 сутки при введении им суспензии, содержащей  $10^3$ - $10^4$  клеток легионелл
- Срок наблюдения 10 дней
- При вскрытии делают мазки отпечатки селезенки и легких (окраска по Романовскому-Гимза)
- Посеве на питательные среды 10 % суспензии селезенки

# УСКОРЕННАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ

- морфология колоний;
- рост на среде с ростовыми добавками при отсутствии роста на контрольной среде (без добавок);
- окраска бактерий по Граму;
- специфическое свечение в МФА;
- результаты ПЦР.



*Legionella pneumophila*



*Legionella pneumophila*, выявленная в отделяемом респираторного тракта методом прямой ИФ



Колонии *Legionella pneumophila*

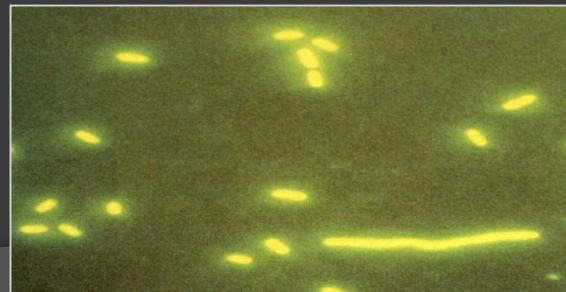
# ИДЕНТИФИКАЦИЯ ЛЕГИОНЕЛЛ

- Латекс-агглютинация (Oxoid, BIO-RAD, Biomerieux\*), 1-15 серогруппы (24 теста)



- Monofluo™ *L. pneumophila* IFA Kit (BIO-RAD)

1 серогруппа (24 теста)



# ЭКСПРЕСС-ТЕСТ DUOPATH® LEGIONELLA Мерк, Германия (Merck KGaA)

Иммунохроматографический тест на основе меченных золотом антител для качественного обнаружения *Legionella spp.* и *Legionella pneumophila* из проб воды и других объектов внешней среды.

Представляет диагностическую тест-панель с круглой лункой для добавления образца и овальным окном с тестовыми зонами (Spec) и (L.pn) и контрольной зоной (C).

Позволяет дать ответ уже через 30 минут после выделения культуры. Чувствительность метода - 1 колония (КОЕ) легионелл.





# РАСШИРЕННАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ

- ⦿ изучение фенотипических и биохимических свойств культуры
- ⦿ определение вирулентности возбудителя с использованием биопробных животных;
- ⦿ окончательная идентификация легионелл до вида и серовара проводят в национальной референс-лаборатории по легионеллезу (ГУ НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва).

# Признак

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 ВСУЕ $\alpha$ -агаре	+	+	+	+	+	+
Рост на кровяном агаре или на ВСУЕ $\alpha$ без L-цистеина	-	-	-	-	-	-
Каталаза	+	+	+	+	+	+
Восстановление нитратов	-	-	-	-	-	-
Ферментация углеводов	-	-	-	-	-	-
Гидролиз гиппурата натрия	+	-	-	-	-	-
Аутофлюоресценция	-	+	+	-	-	-
Желатиназная активность	+	+	+	-	-	+
Образование коричневого пигмента на среде, содержащей тирозин	+	+	+	-	+	+
$\beta$ -лактамазная активность	+	V	+	-	V	V
Оксидаза	V	V	-	+	V	+

# ВЫЯВЛЕНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ К *LEGIONELLA PNEUMOPHILA* СЕРОГРУППЫ 1

- непрямой метод флуоресцирующих антител (НМФА). Набор для реакции непрямой иммунофлуоресценции пр-ва НИИЭМ им. Н.Ф.Гамалеи Минздрава РФ
- Реакция агломерации. Диагностикум легионеллезный серогруппы 1 антигенный сухой для реакции агломерации (пр-во Ростовского-на-Дону НИПЧИ).

# ОПРЕДЕЛЕНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКОГО РАСТВОРИМОГО АНТИГЕНА ЛЕГИОНЕЛЛ В МОЧЕ

## **Binax Legionella Urinary Antigen EIA** (Binax, Inc., США)

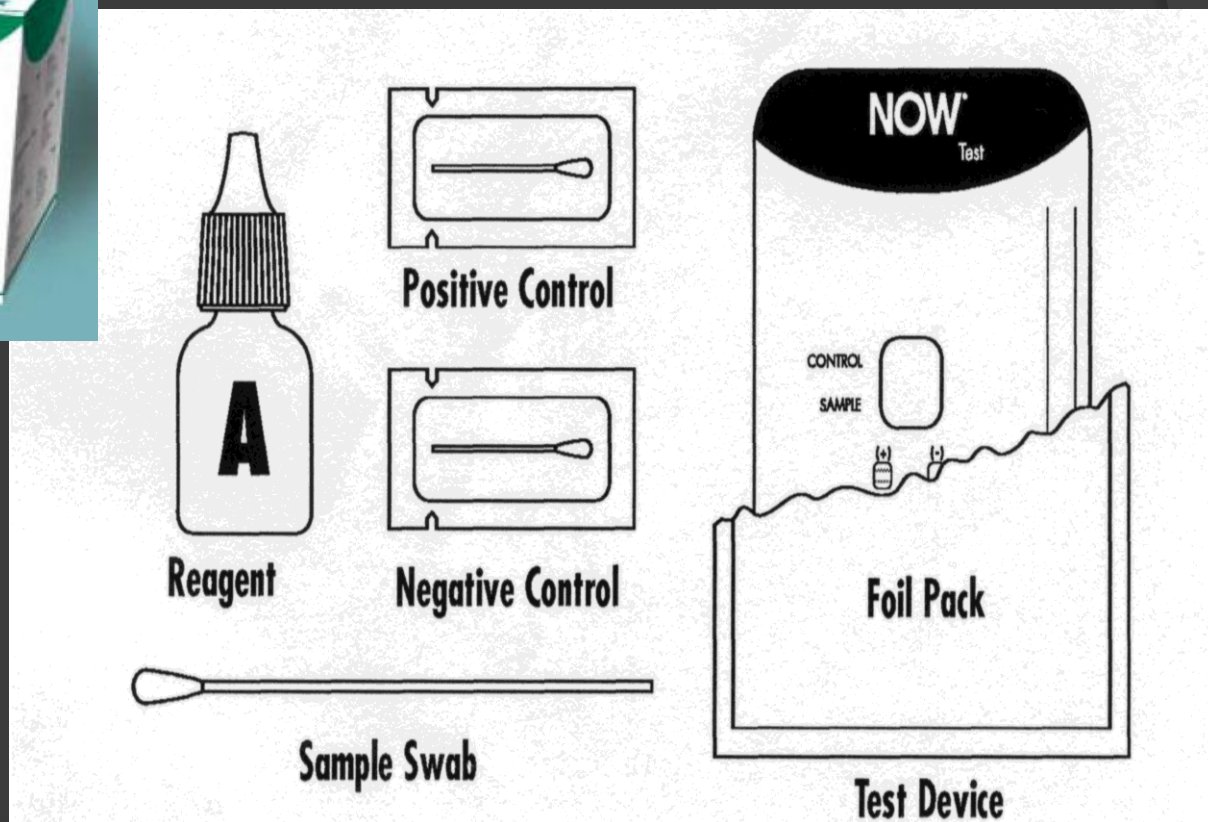
ИФА тест для выявления  
антигена легионелл в моче  
Набор на 96 анализов.  
Одноэтапная постановка  
реакции при комнатной  
температуре (20-25°C).

Время получения результата –  
2,5 часа.



# Binax NOW Legionella Urinary Antigen Test

(быстрый иммунохроматографический тест для выявления антигена легионелл в моче)



# ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ

- экспериментальные серии «АмплиСенс® *Legionella pneumophila* – FRT: набор реагентов для выявления ДНК в биологическом материале и объектах окружающей среды методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» (производства ФБУН ЦНИИ эпидемиологии, г. Москва);
- экспериментальные серии «Легионелла-РЭФ – тест-система для выявления ДНК *Legionella pneumophila* методом ПЦР с учетом результатов путем электрофореза» (производства ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб», г. Саратов);
- iQ-Check *Legionella* производство BIO-RAD – 4 варианта наборов



# ДИАГНОЗ СЧИТАЕТСЯ УСТАНОВЛЕННЫМ ПРИ:

- ⦿ выделении легионелл из респираторного тракта, легочной ткани, крови;
- ⦿ при четырехкратном нарастании уровня специфических антител
- ⦿ определении специфического растворимого антигена легионелл в моче

# ЛАБОРАТОРНОЕ ПОДТВЕРЖДЕНИЕ СЛУЧАЯ ЛЕГИОНЕЛЛЕЗА ПО СТАНДАРТАМ EWGLI (ЕВРОПЕЙСКАЯ ЭКСПЕРТНАЯ РАБОЧАЯ ГРУППА)

- ⦿ Выделение культуры из отделяемого респираторного тракта, ткани легких, крови
- ⦿ Выявление уринарного антигена
- ⦿ Нарастание титра антител, специфичных для *L. pneumophila* серогруппы 1 в 4 раза в парных сыворотках крови