

Е.Б.Ежлова¹, Ю.В.Демина¹, А.Н.Куличенко², С.А.Портенко³, А.С.Гуськов¹, Е.С.Почтарева¹,
И.В.Савельева², А.С.Волюнкина², В.Н.Савельев², М.Е.Михайлова², И.В.Кузнецова², О.А.Бобенко²,
Д.В.Ефременко², Е.С.Казакова³, Т.Ю.Красовская³, В.Е.Куклев³, И.А.Касьян³, Е.А.Билько³,
Е.В.Мицевич⁴, И.П.Мицевич⁴, М.Е.Платонов⁴, М.Г.Теймуразов⁴, О.В.Полосенко⁴, В.Е.Елдинова⁵,
Е.А.Бойко⁵, В.И.Малай⁵, В.П.Клиндухов⁶, Т.В.Гречаная⁶, П.Н.Николаевич⁶, В.А.Бирюков⁶,
И.И.Божко⁶, Л.И.Щербина⁷, О.А.Погудина⁸

ОРГАНИЗАЦИЯ ОБСЛЕДОВАНИЯ И ВЫЯВЛЕНИЕ ВОЗБУДИТЕЛЯ ЛЕГИОНЕЛЛЕЗА В ОБЪЕКТАХ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ В ПЕРИОД ПОДГОТОВКИ И ПРОВЕДЕНИЯ XXII ОЛИМПИЙСКИХ И XI ПАРАЛИМПИЙСКИХ ЗИМНИХ ИГР В СОЧИ

¹Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Москва, Российская Федерация; ²ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт», Ставрополь, Российская Федерация; ³ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация; ⁴ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», п. Оболонск, Российская Федерация; ⁵ФКУЗ «Причерноморская противочумная станция», Новороссийск, Российская Федерация; ⁶Управление Роспотребнадзора по Краснодарскому краю, Краснодар, Российская Федерация; ⁷ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Краснодарском крае», Краснодар, Российская Федерация; ⁸Территориальный отдел Управления Роспотребнадзора по Краснодарскому краю в г.-к. Сочи, Российская Федерация

В статье представлены данные об организации и проведении лабораторного контроля систем горячего водоснабжения спортивных объектов и объектов проживания на присутствие *Legionella pneumophila* во время XXII Олимпийских и XI Паралимпийских зимних игр 2014 г. в Сочи. Обследованы 105 объектов, на 37 выявлены положительные образцы с концентрацией ДНК *L. pneumophila* от $2,19 \cdot 10^2$ до $3,92 \cdot 10^7$ геном-эквивалентов/л. Бактериологическим методом на 16 объектах обнаружена колонизация систем водоснабжения легионеллами, на одном – свыше $1 \cdot 10^4$ КОЕ/л. Проведен сравнительный анализ результатов полученных при использовании метода ПЦР и бактериологического анализа. По результатам генотипирования семи выделенных штаммов легионелл серогруппы 1 и двух штаммов серогрупп 2–14 сделано заключение о генетической неоднородности штаммов *L. pneumophila*, циркулирующих в регионе г.-к. Сочи.

Ключевые слова: Олимпийские игры, легионеллез, *Legionella pneumophila*, микробиологический мониторинг, полимеразная цепная реакция, бактериологический метод, генотипирование.

Е.В.Ezhlova¹, Yu.V.Demina¹, A.N.Kulichenko², S.A.Portenko³, A.S.Gus'kov¹, E.S.Pochtareva¹, I.V.Savel'eva²,
A.S.Volynkina², V.N.Savel'ev², M.E.Mikhailova², I.V.Kuznetsova², O.A.Bobenko², D.V.Efremenko²,
E.S.Kazakova³, T.Yu.Krasovskaya³, V.E.Kuklev³, I.A.Kas'yan³, E.A.Bil'ko³, E.V.Mitsevich⁴, I.P.Mitsevich⁴,
M.E.Platonov⁴, M.G.Teimurazov⁴, O.V.Polosenko⁴, V.E.Eldinova⁵, E.A.Boiko⁵, V.I.Malay⁵, V.P.Klindukhov⁶,
T.V.Grechanaya⁶, P.N.Nikolaevich⁶, V.A.Biryukov⁶, I.I.Bozhko⁶, L.I.Shcherbina⁷, O.A.Pogudina⁸

Management of the Investigation and Detection of Legionellosis Agent in the Environmental Samples during the Preparation and Holding of the XXII Winter Olympics and XI Paralympics in Sochi

¹Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare, Moscow, Russian Federation; ²Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russian Federation; ³Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation; ⁴State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation; ⁵Black-Sea Plague Control Station, Novorossiysk, Russian Federation; ⁶Rospotrebnadzor Administration in the Krasnodar Territory, Krasnodar, Russian Federation; ⁷Center of Hygiene and Epidemiology in the Krasnodar Territory, Krasnodar, Russian Federation; ⁸Territorial Subdivision of the Rospotrebnadzor Administration in the Krasnodar Territory in the Resort Town of Sochi, Russian Federation

Provided are the data on the management and carrying out of the laboratory control over the hot-water supply systems of the sports venues and accommodation areas for the presence of *Legionella pneumophila* during the XXII Olympics and XI Paralympics in Sochi, 2014. Inspected have been 105 facilities. The samples from 37 of them showed positive. *L. pneumophila* DNA concentration varies between $2.19 \cdot 10^2$ and $3.92 \cdot 10^7$ genome equivalents (g.e.)/l. By means of bacteriological investigation detected have been legionella colonies in the water supply systems of 16 facilities, at one of the items – the loading is over $1 \cdot 10^4$ colony-forming units/l. Performed has been comparative analysis of the results obtained using PCR assay and bacteriological test. Based on the genotyping of 7 isolated strains serogroup 1 and 2 strains of 2–14 serogroups it is concluded that *L. pneumophila* strains circulating in the resort town Sochi are genetically heterogeneous.

Key words: Olympic Games, legionellosis, *Legionella pneumophila*, microbiological survey, polymerase chain reaction, bacteriological test, genotyping.

Эпидемические вспышки и спорадические случаи легионеллеза связаны с системами водоснабжения, кондиционирования и охлаждения, контаминированными *Legionella pneumophila* [2]. Особенную актуальность легионеллезная инфекция, или «болезнь путешественников», приобретает в период проведения международных массовых мероприятий, что связано с большим притоком людей, пользующихся услугами гостиничных комплексов, круизных лайнеров и т.п. Основой профилактики легионеллезной инфекции является проведение мониторинговых исследований уровня контаминации легионеллами потенциально опасных водных объектов, генерирующих мелкодисперсный водный аэрозоль (горячего водоснабжения, централизованных систем кондиционирования, бассейнов и т.д.), а также своевременное проведение профилактических и дезинфекционных мероприятий [3, 5]. Для обеспечения эпидемического благополучия в период проведения XXII Олимпийских и XI Паралимпийских зимних игр 2014 года в Сочи (далее Олимпийские игры) была задействована специализированная противоэпидемическая бригада (СПЭБ) Ставропольского противочумного института, усиленная специалистами ведущих НИИ и других учреждений Роспотребнадзора: ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб», ФБУН ГНЦ ПМБ, ФКУЗ «Причерноморская противочумная станция», ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии» в субъектах СКФО. Одной из задач СПЭБ было проведение лабораторных исследований объектов окружающей среды на наличие *L. pneumophila*.

Цель работы – анализ порядка организации и проведения лабораторного контроля систем горячего водоснабжения на наличие возбудителя легионеллеза во время Олимпийских игр.

Материалы и методы

Лабораторный мониторинг контаминации систем горячего водоснабжения возбудителем легионеллеза проводили в соответствии с разработанным документом [1].

На подготовительном этапе для лабораторного контроля на наличие легионелл были выбраны 105 объектов, в том числе 7 спортивных объектов прибрежного кластера (дворец зимнего спорта «Айсберг», ледовый дворец «Большой», ледовая арена «Шайба», ККЦ «Адлер-арена»; керлинг-центр «Ледяной Куб», тренировочный комплекс для фигурного катания, тренировочный комплекс для хоккея), 4 не соревновательных объекта (центральный стадион «Фишт», аэропорт «Сочи», Главный медиа-центр, Горки медиа-центр) и 94 объекта проживания спортсменов и гостей (гостиницы, пансионаты и т.п.). В зависимости от размера объекта, количества жилых номеров (для объектов проживания) для каждого из них определено число контрольных точек (от 1 до 8). Отбор проб воды проводили из водопроводных кранов, душевых рожков.

Исследование проводили в соответствии с МУК 4.2.2217-07 «Выявление бактерий *L. pneumophila* в объектах окружающей среды» и ГОСТ Р 51592-2000 «Вода. Общие требования к отбору проб». При заборе материала контролировали температуру воды в системе горячего водоснабжения.

С целью сокращения сроков проведения исследований и своевременного осуществления профилактических и противоэпидемических мероприятий в качестве основного метода диагностики использовали ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени. Выделение ДНК проводили с помощью набора реагентов «ДНК-сорб-В» (ИнтерЛабСервис, Москва), постановку ПЦР – с применением тест-системы «АмплиСенс *Legionella pneumophila*-FL» (ИнтерЛабСервис, Москва). Пробы, в которых при постановке качественной ПЦР была обнаружена ДНК *L. pneumophila*, исследовали повторно методом количественной ПЦР, начиная с этапа выделения ДНК.

По результатам ПЦР выдавался ответ о выявлении и количестве ДНК легионелл в исследуемой пробе, а также заключение о необходимости проведения профилактических и дезинфекционных мероприятий. При обнаружении в пробе ДНК легионелл в концентрации $1 \cdot 10^2$ – $9 \cdot 10^3$ геном-эквивалентов/л (г.э./л) выдавалось предписание о проведении комплекса профилактических мероприятий, при обнаружении более чем $1 \cdot 10^4$ г.э./л – дезинфекционных мероприятий.

Пробы, содержащие ДНК *L. pneumophila* в количестве, превышающем $1 \cdot 10^3$ г.э./л, исследовали бактериологическим методом, анализ проводился в соответствии с МУК 4.2.2217-07. Генетическое типирование выделенных штаммов выполняли с помощью метода мультилокусного секвенирования-типирования (MLST) по протоколу Европейской исследовательской группы по легионеллезу (ESGLI) Sequence-Based Typing protocol for epidemiological typing of *L. pneumophila*, version 5.0.

Результаты и обсуждение

Анализ воды из систем горячего водоснабжения на наличие легионелл проводили за 20 дней до открытия Олимпийских игр. За этот период было исследовано 376 проб, в том числе 30 проб, отобранных на спортивных объектах, 24 – на не соревновательных объектах и 322 – на объектах проживания.

При первичном обследовании 105 объектов (222 пробы) методом ПЦР положительные образцы выявлены на 37 (65 проб) с концентрацией ДНК *L. pneumophila* от $2,19 \cdot 10^2$ до $3,92 \cdot 10^7$ г.э./л. На основании полученных результатов были выданы предписания о необходимости немедленного проведения профилактических и дезинфекционных мероприятий в соответствии с СП 3.1.2.2626-10. С целью контроля эффективности выполненных мероприятий данные объекты обследовались повторно (62 пробы), при этом возбудитель легионеллеза выявлен на 11 объ-

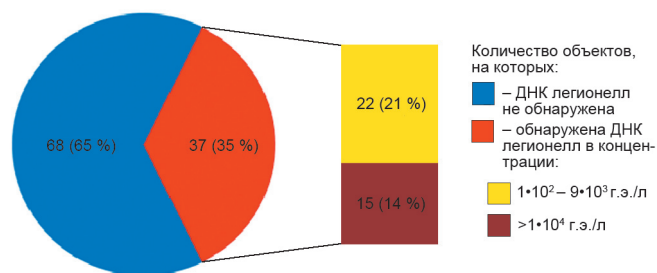


Рис. 1. Результаты обследования объектов на наличие в системах горячего водоснабжения ДНК *L. pneumophila* методом ПЦР

ектах (25 проб) с концентрацией ДНК легионелл $5,09 \cdot 10^2 - 9,03 \cdot 10^4$ г.э./л. На 5 объектах *L. pneumophila* обнаружена и при третьем исследовании (7 проб) с концентрацией ДНК возбудителя $1,98 \cdot 10^2 - 7,81 \cdot 10^4$ г.э./л.

В межсоревновательный период и во время проведения Паралимпийских игр на наличие легионелл повторно были обследованы 25 объектов, в том числе несоревновательных – 4, спортивных – 3, жилых – 18. Всего исследована 71 проба воды, выявлено 6 образцов с концентрацией ДНК легионелл от $1,36 \cdot 10^2$ до $1,83 \cdot 10^3$ г.э./л.

Таким образом, по результатам ПЦР исследований контаминация систем горячего водоснабжения ДНК *L. pneumophila* выявлена на 37 объектах, из них спортивных – 4 (57 %), не соревновательных – 2 (50 %), жилых – 31 (32,9 %), рис. 1. При исследовании бактериологическим методом колонизация систем водоснабжения легионеллами обнаружена на 16 объектах: 1 – спортивном, 1 – не соревновательном, 14 – жилых объектах (рис. 2). Всего методом ПЦР исследовано 376 образцов воды. ДНК *L. pneumophila* в различной концентрации выявлена в 103 образцах (27,4 %). Для подтверждения результатов 75 проб, положительных в ПЦР, с концентрацией ДНК *L. pneumophila* более $1 \cdot 10^3$ г.э./л исследованы бактериологическим методом. В результате из 33 проб (8,8 % от общего числа) выделены культуры, которые по совокупности морфологических, культуральных, серологических и генетических признаков идентифицированы как *L. pneumophila*, концентрация возбудителя составила от $4 \cdot 10^1$ до $2,18 \cdot 10^4$ КОЕ/л.

По результатам агглютинации с латекс-диагностикумом *Legionella latex test* (Oxoid) 7 культур были отнесены к 1-й серогруппе, 26 – ко 2–14-й серогруппам.

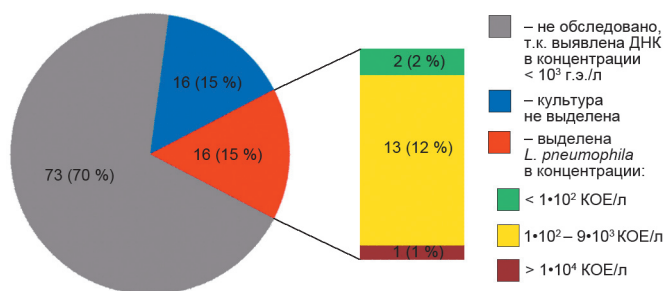


Рис. 2. Результаты обследования объектов на наличие в системах горячего водоснабжения *L. pneumophila* бактериологическим методом

Проведено MLST-типирование 7 штаммов 1-й серогруппы и 2 штаммов 2–14-й серогрупп. Среди штаммов 1-й серогруппы преобладал сиквенс-тип ST-1 (аллельный профиль: *flaA-1, pilE-4, asd-3, mip-1, tomPS-1, proA-1, neuA-1*), являющийся наиболее распространенным в мире, к которому относились шесть изолятов. Еще один штамм 1-й серогруппы отнесен к сиквенс-типу ST-366 (аллельный профиль: *flaA-2, pilE-10, asd-3, mip-3, tomPS-9, proA-4, neuA-6*). Аллельный профиль двух штаммов легионелл 2–14-й серогрупп значительно отличался от штаммов 1-й серогруппы: *flaA-3, pilE-10, asd-1, mip-28, tomPS 14, proA 9, neuA-0*.

В результате проведения MLST выявлена генетическая неоднородность штаммов *L. pneumophila*, циркулирующих в регионе г.к. Сочи. Данные о сиквенс-типах штаммов могут быть использованы при эпидемиологической расшифровке случаев заболевания легионеллезом.

При сравнении результатов ПЦР и бактериологических исследований установлено, что количество положительных результатов, полученных методом ПЦР, в 3,3 раза больше, чем культуральным методом. Концентрация ДНК возбудителя в пробе (г.э./л), выявленная с помощью ПЦР, также была, как правило, выше, чем концентрация микробных клеток (КОЕ/л), определенная при бактериологическом анализе. Это позволяет предположить выявление ДНК мертвых микробных клеток [3, 4, 5].

Опыт применения количественной ПЦР как основного метода при проведении мониторинговых исследований уровня контаминации систем горячего водоснабжения возбудителем легионеллеза показал, что его достоинством является сокращение сроков выполнения анализа до 1–2 сут, минимизация трудозатрат персонала и возможность своевременного проведения профилактических и дезинфекционных мероприятий. Однако выявлен низкий процент корреляции результатов ПЦР и бактериологического исследования. Возможность детекции ДНК мертвых микробных клеток при постановке ПЦР приводит к получению ложноположительных результатов и невозможности применения данного метода для контроля эффективности профилактических и дезинфекционных мероприятий. Существенные количественные различия между концентрацией геномных копий возбудителя, выявляемых в ПЦР, и числом колоний образующих единиц, определяемых при бактериологическом исследовании, свидетельствуют о необходимости более четкого определения места количественной ПЦР в схеме лабораторного анализа и разработки соответствующей нормативно-методической базы, регламентирующей роль генодиагностических методов при проведении мониторинговых исследований контаминации водных объектов *L. pneumophila*.

Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Порядок лабораторного обеспечения исследований проб окружающей среды в период проведения XXII Олимпийских зимних игр и XI Паралимпийских зимних игр 2014 года в г. Сочи. URL: <http://www.snipchi.ru> (дата обращения 12.09.14).
2. Тартаковский И.С., Темежникова Н.Д., Карпова Т.И. Легионеллез: проблемы и перспективы лабораторной диагностики. *Пробл. особо опасных инф.* 2005; 90:17–23.
3. Kao P.M., Tung M.C., Hsu B.M., Chiu Y.C., She C.Y., Shen S.M., Huang Y.L., Huang W.C. Identification and quantitative detection of *Legionella* spp. in various aquatic environments by real-time PCR assay. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 2013; 20(9):6128–37.
4. Bonetta Sa., Bonetta Si., Ferretti E., Balocco F., Carraro E. Evaluation of *Legionella pneumophila* contamination in Italian hotel water systems by quantitative real-time PCR and culture methods. *J. Appl. Microbiol.* 2010; 108(5):1576–83.
5. Yáñez M.A., Nocker A., Soria-Soria E., Múrtula R., Martínez L., Catalán V. Quantification of viable *Legionella pneumophila* cells using propidium monoazide combined with quantitative PCR. *J. Microbiol. Methods.* 2011; 85(2):124–30.

References

1. [Procedures for the laboratory support of the environmental sample investigations during the XXII Olympics and XI Paralympics in the resort town Sochi, 2014] (cited 12 Sep 2014). Available from: <http://www.snipchi.ru>.
2. Tartakovsky I.S., Temezhnikova N.D., Karpova T.I. [Legionellosis: problems and prospects of laboratory diagnosis]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2005; 90:17–23.
3. Kao P.M., Tung M.C., Hsu B.M., Chiu Y.C., She C.Y., Shen S.M., Huang Y.L., Huang W.C. Identification and quantitative detection of *Legionella* spp. in various aquatic environments by real-time PCR assay. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 2013; 20(9):6128–37.
4. Bonetta Sa., Bonetta Si., Ferretti E., Balocco F., Carraro E. Evaluation of *Legionella pneumophila* contamination in Italian hotel water systems by quantitative real-time PCR and culture methods. *J. Appl. Microbiol.* 2010; 108(5):1576–83.
5. Yáñez M.A., Nocker A., Soria-Soria E., Múrtula R., Martínez L., Catalán V. Quantification of viable *Legionella pneumophila* cells using propidium monoazide combined with quantitative PCR. *J. Microbiol. Methods.* 2011; 85(2):124–30.

Authors:

Ezhlova E.B., Demina Yu.V., Gus'kov A.S., Pochtareva E.S. Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare. 18, Bld. 5 and 7, Vadkovsky Pereulok, Moscow, 127994, Russian Federation.
 Kulichenko A.N., Savel'eva I.V., Volynkina A.S., Savel'ev V.N., Mikhailova M.E., Kuznetsova I.V., Bobenko O.A., Efremenko D.V. Stavropol Research Anti-Plague Institute. 13–15, Sovetskaya St., Stavropol, 355035, Russian Federation. E-mail: snipchi@mail.stv.ru

Portenko S.A., Kazakova E.S., Krasovskaya T.Yu., Kuklev V.E., Kas'yan I.A., Bil'ko E.A. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Mitsevich E.V., Mitsevich I.P., Platonov M.E., Teimurazov M.G., Polosenko O.V. State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology. Obolensk, Moscow Region, 142279, Russian Federation. E-mail: info@obolensk.org

Eldinova V.E., Boiko E.A., Malay V.I. Black Sea Plague Control Station. 90, Kunikova St., Novorossiysk, 353919, Russian Federation. E-mail: novppchs@rambler.ru

Klindukhov V.P., Grechanaya T.V., Nikolaevich P.N., Biryukov V.A., Bozhko I.I. Rospotrebnadzor Administration in the Krasnodar Territory. 100, Rashpilevskaya St., Krasnodar, 350000, Russian Federation. E-mail: upravlenie@kubanrpn.ru

Shcherbina L.I. Center of Hygiene and Epidemiology in the Krasnodar Territory. Krasnodar, Russian Federation.

Pogudina O.A. Territorial Subdivision of the Rospotrebnadzor Administration in the Krasnodar Territory in the Resort Town of Sochi. 27, Roz St., Sochi, 354000, Russian Federation.

Об авторах:

Ежлова Е.Б., Демина Ю.В., Гуськов А.С., Почтарева Е.С. Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. Российская Федерация, 127994, Москва, Вадковский переулок, дом 18, строение 5 и 7.

Куличенко А.Н., Савельева И.В., Волынкина А.С., Савельев В.Н., Михайлова М.Е., Кузнецова И.В., Бобенко О.А., Ефременко Д.В. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: snipchi@mail.stv.ru

Портенко С.А., Казакова Е.С., Красовская Т.Ю., Куклев В.Е., Касьян И.А., Билько Е.А. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Мицевич Е.В., Мицевич И.П., Платонов М.Е., Теймуразов М.Г., Полосенко О.В. Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии. Российская Федерация, 142279, Московская обл., п. Оболенск. E-mail: info@obolensk.org

Елдинова В.Е., Бойко Е.А., Малай В.И. Причерноморская противочумная станция. Российская Федерация, 353919, Краснодарский край, Новоросийск, ул. Куникова, 90. E-mail: novppchs@rambler.ru

Клиндухов В.П., Гречаная Т.В., Николаевич П.Н., Бирюков В.А., Божко И.И. Управление Роспотребнадзора по Краснодарскому краю. Российская Федерация, 350000, Краснодар, ул. Рашилевская, 100. E-mail: upravlenie@kubanrpn.ru

Щербина Л.И. Центр гигиены и эпидемиологии в Краснодарском крае». Российская Федерация, Краснодар.

Погудина О.А. Территориальный отдел Управления Роспотребнадзора по Краснодарскому краю в г.-к. Сочи. Российская Федерация, 354000, Краснодарский край, Сочи, ул. Роз, 27.

Поступила 09.12.14.