



Что важнее: методика или объект?

Выделение легионелл из воды - необходимость дифференцированного подхода

За более чем тридцатипятилетний период, прошедший с момента первой вспышки легионеллеза, критерии оценки эпидемической безопасности различных объектов окружающей среды претерпели существенные изменения. В связи с неравнозначностью различных искусственных водных систем как потенциального источника возбудителя, а также в связи с постоянно увеличивающейся прослойкой в человеческой популяции лиц с различного рода иммунодефицитами, в настоящее время требования эпидемической безопасности в отношении легионелл дифференцированы по типам объектов и жесточены. Если до недавнего времени предельно допустимый порог легионелл в воде различных объектов составлял 104 КОЕ/л [3, 4], то сейчас в отечественной нормативной базе для систем горячего и холодного водоснабжения порог эпидемической опасности определен в 103 КОЕ/л, а системы водоснабжения лечебно-профилактических учреждений вообще не должны их содержать [6].

Общие принципы выделения и оценки количества бактерий рода *Legionella* в пробах из объектов окружающей среды нашли отражение в стандартах ISO 11731:1998 «Качество воды - Обнаружение и количественный учет *Legionella*» и ISO 11731-2:2004 «Качество воды - Обнаружение и количественный учет *Legionella* - Часть 2: Метод прямой мембранной фильтрации для вод с низким количеством микроорганизмов». В отечественной нормативной базе данную область деятельности регламентируют МУК 4.2.2217-07 «Выявление бактерий *Legionella pneumophila* в объектах окружающей среды».

Материалы и методы

В работе использованы результаты, полученные при исследовании проб питьевой, природной воды, а

Анализ результатов исследования 543 проб воды различных типов на наличие и количественное содержание легионелл, полученных за пять лет работы, выявил прямую зависимость результата исследования от сочетания целого ряда независимых факторов. На эффективность выделения легионелл помимо селективности и специфичности самих методик исследования, влияющих, прежде всего, от способа пробоподготовки, оказывают такие параметры самого объекта исследования, как общий уровень контаминации посторонней флорой, соотношение уровней содержания легионелл и нецелевой флоры, а также видовой состав биоценоза объекта.

также воды технологических циклов различных предприятий.

Пробы были исследованы согласно методикам, представленным в ISO 11731:1998 «Качество воды - Обнаружение и количественный учет *Legionella*», ISO 11731-2:2004 «Качество воды - Обнаружение и количественный учет *Legionella* - Часть 2: Метод прямой мембранной фильтрации для вод с низким количеством микроорганизмов» и МУК 4.2.2217-07 «Выявление бактерий *Legionella pneumophila* в объектах окружающей среды».

Часть проб была исследована двумя методами ISO 11731-2:2004 и МУК 4.2.2217-07.

При исследовании влияния мембранных фильтров (МФ) на ростовые свойства ВСУЕ-среды с селективной добавкой GVPC была использована методика определения % всхожести, изложенная в [5].

В качестве эталонных культур были использованы *L.pneumophila* ATCC 33152 и *E.coliaceae* 22817 из рабочей коллекции эталонных культур ОБМА ЗАО «РОСА».

Полученные результаты

За период с конца 2007 по сентябрь 2012 года в отделе биологических методов анализа ЗАО «РОСА» было исследовано 543 пробы вод разных типов, 91 из которых (16.8%) содержали один или несколько серотипов *L.pneumophila* (таблица 1).

Доминирующим серотипом являлся *L.pneumophila* 1. В виде моносеротипа он выделялся из 66% положительных проб. Представители серогруппы *L.pneumophila* 2-14 выделялись из 18% проб, а из 16% положительных проб одновременно выделялись *L.pneumophila* 1 и *L.pneumophila* 2-14.

Таким образом, наиболее значимый в эпидемиологическом плане серотип суммарно выделялся из 82% положительных проб.

В пробах воды из градирен преобладал серотип 1, что перекликается с данными, представленными в работе [7], или его сочетание с легионеллами серогруппы 2-14. Этот же серотип преобладал и в пробах воды из объектов, подключенных к централизованному водоснабжению. Примечательно, что несколько серотипов из одной пробы выделялись в основном из воды градирен или элементов системы охлаждения, связанных с градирнями, что свидетельствует о важной эпидемической значимости этого типа объектов.

В структуре положительных проб 50 являлись водой централизованного водоснабжения (в основном из душевых установок (92%), 1 проба - природной воды и 40 были пробами технической воды различных технологических циклов предприятий.

Диапазон значений количества легионелл в пробах воды централизованного водоснабжения находился в пределах 1-8100 КОЕ/л (в среднем 1200 КОЕ/л). В 30% проб питьевой воды уровень легионелл превысил новый эпидемически значимый уровень, рекомендованный [6].

В пробах технической воды диапазон значений количества легионелл колебался от 1 до 1300000 КОЕ/л (в среднем 130000 КОЕ/л). В 17 пробах (41% от общего числа положительных проб технической воды) уровень контаминации легионеллами превысил эпидемический порог в 10000 КОЕ/л.

Таблица 1. Распределение серотипов *L.pneumophila* по объектам выделения в структуре положительных проб

Объект	Серотипы <i>L. pneumophila</i>		
	1	2-14	1+(2-14)
Питьевая вода	46	3	1
Градирни и объекты, связанные с градирнями	11	6	14
Прочие пробы технической воды	3	6	0
Природная вода	0	1	0
Всего	60	16	15



14 из них были пробами воды из градирен или элементов системы охлаждения, связанных с градирнями. Градирни также были основным объектом выделения легионелл в структуре положительных проб технической воды (76%). О важной эпидемической значимости этого объекта свидетельствует еще и тот факт, что половина исследованных проб воды из градирен содержала легионеллы, тогда как в пробах технической воды из других объектов легионеллы выделялись только из 10% проб. Полученные нами результаты по контаминации легионеллами различных технологических объектов предприятий несколько ниже результатов, приведенных в [8].

При анализе структуры отрицательных проб была выявлена достаточно большая доля проб (27%), результат которых следует считать условно-отрицательным (таблица 2).

В 123 пробах из 329 отрицательных (23% из всех исследованных проб), результат был определен как значение $<n$ КОЕ/л, где n - минимальное количество легионелл, которое может быть определено в исследованном объеме. Данное значение определялось максимальным исследованным объемом пробы. В подавляющем большинстве (82%) таких условно отрицательных проб результат составлял от <2 до <100 КОЕ/л. Причина выдачи такого результата заключалась либо в невозможности учета посева одного из объемов пробы из-за плесневого или другого постороннего роста, либо в методических особенностях исследования (при стандартном исполнении методики [4] для анализа проб технической воды исследовался объем концентрата, эквивалентный 10 мл исходной пробы).

Однако в 13% проб от числа условно отрицательных (3% от всех исследованных) было невозможно исследовать более 1 мл пробы (<1000 КОЕ/л), а в 5% (1,2%) более 0,1 мл (<10000 КОЕ/л). Причина заключалась в высокой контаминации образцов посторонней нецелевой флорой.

21 проба из числа положительных была исследована двумя методами, [4] и [2], и только в 9 случаях числовое значение результата было получено обоими методами одновременно (таблица 3). В трех случаях метод [4] оказался недостаточно чувствительным. В четырех ситуациях при высоких уровнях контаминации проб целевыми микроорганизмами результат также был получен методом [2], несмотря на его меньшую селективность. Причина заключается в большей гибкости и простоте исполнения, что позволяет параллельно исследовать большой диапазон объемов пробы: от

■ **Таблица 2.** Структура результатов отрицательных проб по исследованному объему

Результат (КОЕ/л)	Исследованный объем (мл)	Количество проб
$n \setminus обн$	1000	329
$<n$	<1000	123
<100	≤ 10	101
<10000	≤ 1	16
<100000	$\leq 0,1$	3
<1000000	$\leq 0,01$	3

■ **Таблица 3.** Результативность разных методик при параллельном исследовании положительных проб

ИСО-2* = n	ИСО-2* = n	ИСО-2* = n	ИСО-2* < 10	ИСО-2* = $уч/н$
МУК** < 33	МУК** = $уч/н$	МУК** = n	МУК** = n	МУК** = n
3	4	9	1	4

* - ИСО-2 соответствует [2]; ** - МУК соответствует [4]

■ **Таблица 4.** Влияние МФ на ростовые свойства ВСУЕ среды

Серия	Среднее количество колоний		% всхожести в прямом посеве по сравнению с МФ
	в прямом посеве	на МФ	
L.pneumophila ATCC33152			
Серия 1	39	253	15%
Серия 2	34,4	123,6	28%
Enterobacter cloacae 22817			
Серия 1	74,6	84,4	88%

нормируемого до самого маленького. Методом [4] в данной ситуации также можно получить числовой результат, однако для этого требуется исследование нескольких разведений концентрата, что более трудоемко и требует большого расхода среды. В четырех случаях несостоятельным оказался метод [2], вследствие более низкой ингибирующей активности. Такая ситуация как правило наблюдается в случаях массивной контаминации пробы нецелевой флорой. В тех же 9 пробах, где числовое значение результата было получено обоими методами, результаты, полученные на МФ [2], в среднем в 7 (0,6-30) раз были выше результатов, полученных альтернативным методом [4].

Обсуждение результатов

Полученные результаты свидетельствуют о том, что существующие методики выделения легионелл из объектов окружающей среды, основанные на культуральном методе, не всегда позволяют достоверно определить наличие легионелл в объекте и оценить реальные уровни контаминации этими микроорганизмами. Параллельное исследование образцов разными методами продемонстрировало их различную чувствительность и селективность.

На наш взгляд, разная эффективность методик в тех или иных случаях была предопределена различиями в способах подготовки материала для исследования.

Для концентрирования проб [1] в качестве равноценных методов рассматривает мембранную фильтрацию

или центрифугирование. Последнее предпочтительнее при концентрировании проб мутных, окрашенных или содержащих взвеси. После концентрирования пробы на фильтре материал смывают с МФ, а смыв исследуют. Метод [4] подразумевает двухэтапное концентрирование сначала мембранной фильтрацией с последующей отмывкой МФ (как по [1]), затем центрифугированием элюата. Такой способ подготовки позволяет достичь более высокой степени концентрации пробы.

Основные потери на этом этапе пробоподготовки, снижающие чувствительность метода, происходят при смывании концентрата пробы с фильтра. Потери также могут возникать при удалении надосадочной жидкости после центрифугирования.

Наши результаты, полученные ранее [9] в опытах по отмывке суспензий эталонных штаммов, сконцентрированных на разных типах мембран, показали, что при отмывке суспензии *L.pneumophila* ATCC33152 терялось от 52 до 97% клеток, в зависимости от типа мембраны.

Возможно, такие результаты отчасти обусловлены особенностями эталонной культуры или легионелл вообще, поскольку аналогичный эксперимент, выполненный на модели *Enterobacter cloacae* 22817, показал более высокие результаты.

Метод [2] отмывку фильтров не подразумевает, т.к. концентрирование пробы выполняется вакуумной фильтрацией через нитратцеллюлозные фильтры с диаметром пор 0,45



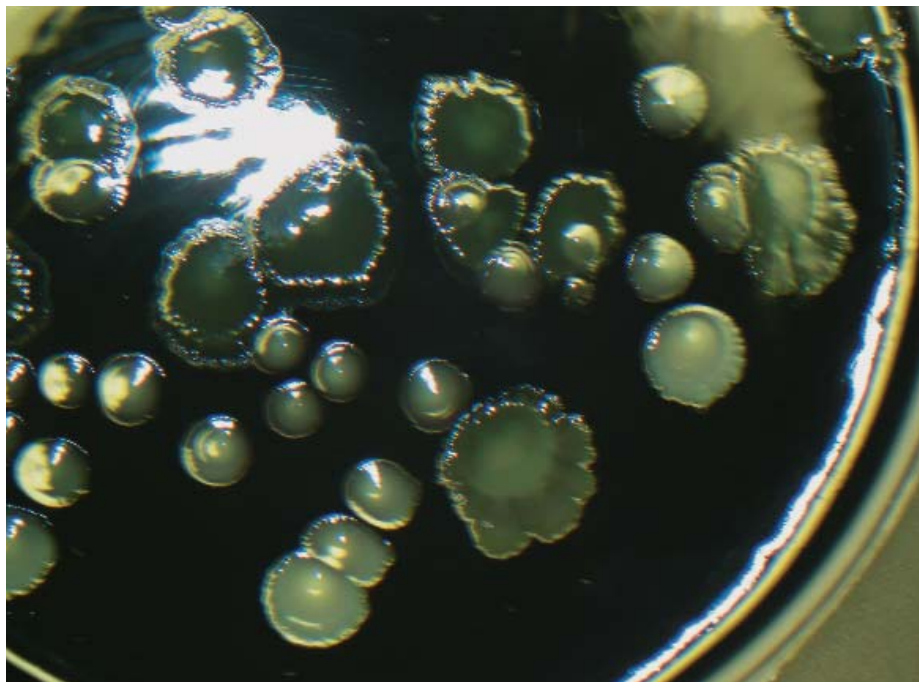
мкм, которые непосредственно укладываются на питательную среду.

Введение мембранного фильтра в систему микроорганизм - селективная питательная среда существенно снижает ее ингибирующую активность в отношении микроорганизмов, прежде всего целевых, что в разы повышает чувствительность, но снижает селективность метода.

Результаты, полученные на *L.pneumophila* ATCC33152, продемонстрировали значительное повышение ростовых свойств ВСУЕ-среды (снижение ингибирования целевых штаммов) при использовании мембранного метода посева (таблица 4).

Согласно [4] и [1] для селективной деконтаминации треть подготовленной пробы подвергают термической обработке, треть обрабатывают кислотным буфером, а одну треть оставляют не обработанной. [2] регламентирует обработку кислотой всего концентрата пробы, после чего фильтр с концентрированной пробой отмывается от кислоты. По [1] и [4] материал от кислоты не отмывается. Это повышает селективность метода, но снижает чувствительность. Дальнейшее исследование проб идентично во всех методиках.

Однако даже методы, обладающие высокой селективностью, в 4% проб не позволили исследовать объем, достаточный для определения наличия и оценки допустимых пороговых значений концентрации легионелл в объекте. На наш взгляд, причина заключалась в недостаточной ингибирующей емкости системы: селективная деконтаминация + селективная питательная среда. По нашим данным, суммарная ингибирующая активность этой системы находилась в диапазоне от 102 до 106 КОЕ в зависимости от методики и способа обра-



E.cloacae 22817 и *P.aeruginosa* ATCC 9027 (5 сутки; GVPC)

ботки пробы перед посевом (таблица 5). Степень ингибиции рассчитывалась как отношение расчетного значения ОМЧ (общего микробного числа) к фактическому общему количеству колоний, выросших на селективной среде после селективной деконтаминации концентрата пробы.

Полученные результаты демонстрируют, что эффективность методики зависит не только от уровня контаминации исследуемого объекта посторонней микрофлорой и способа обработки пробы. Это особенно заметно по результатам, полученным после термической обработки пробы (таблица 5).

Вероятно, что факторами, влияющими на эффективность выделения легионелл, являются видовой состав

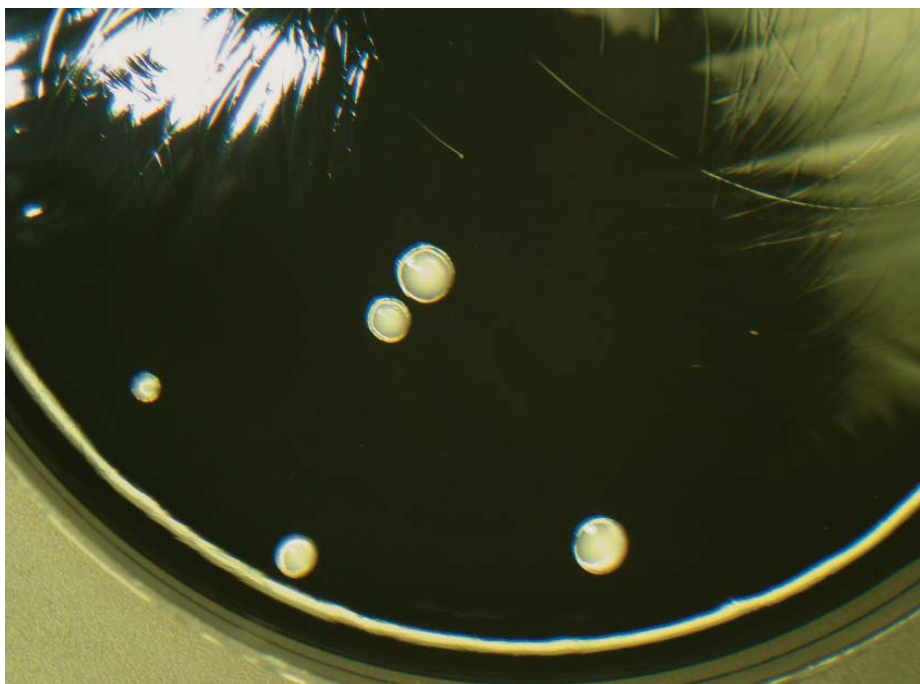
биоценоза пробы, а также соотношение уровней содержания посторонней микрофлоры и легионелл. Существуют виды бактерий, практически не чувствительные к применяемому в методиках селективному воздействию.

Примером могут служить выделенные нами устойчивый штамм *Enterobacter cloacae* 22817 (см. фото). Штамм *Enterobacter* мы использовали как пример нецелевой флоры в предыдущих работах по оценке влияния мембранного фильтра на ингибирующую активность селективной среды для выделения легионелл и определения степени элюции бактерий при отмывке фильтров. В этих опытах данный штамм продемонстрировал гораздо меньшую степень ингибиро-

Таблица 5. Суммарная степень ингибиции постороннего роста (пробоподготовка + селективная среда) при определении легионелл разными методами

№ пробы (объект анализа)	Метод	V пробы (мл)	способ обработки*	ОМЧ 30°C (КОЕ/мл)	ОМЧ		суммарная степень ингибиции
					расчетное (КОЕ/объем)	фактическое (КОЕ/объем)	
1 кондиционер	[2]	10	к (мф)	$1,6 \cdot 10^5$	$1,6 \cdot 10^6$	4	$4 \cdot 10^5$
		100	к (мф)	$1,6 \cdot 10^5$	$1,6 \cdot 10^7$	102	105
	[4]	10	т	$1,6 \cdot 10^5$	$1,6 \cdot 10^6$	нет роста	$> 10^6$
		5	к	$1,6 \cdot 10^5$	$0,8 \cdot 10^6$	4	$4 \cdot 10^5$
2 кондиционер	[2]	10	к (мф)	$1,2 \cdot 10^4$	$1,2 \cdot 10^5$	нет роста	$> 10^6$
		100	к (мф)	$1,2 \cdot 10^4$	$1,2 \cdot 10^6$	6	$2 \cdot 10^5$
3 кондиционер	[1]	20	т	$2,6 \cdot 10^5$	$5,2 \cdot 10^6$	учет невозможен	$< 10^4$
		10	к	$2,6 \cdot 10^5$	$2,6 \cdot 10^6$	3	$0,9 \cdot 10^6$
4 градирня	[2]	10	к (мф)	890	8900	20	$4,5 \cdot 10^2$
5 камера проверки герметичности	[1]	20	т	$1,3 \cdot 10^6$	$2,6 \cdot 10^7$	учет невозможен	$< 10^4$
		10	к	$1,3 \cdot 10^6$	$1,3 \cdot 10^7$	102	105
		2	т	$1,3 \cdot 10^6$	$2,6 \cdot 10^6$	учет невозможен	$< 10^4$
		1	к	$1,3 \cdot 10^6$	$1,3 \cdot 10^6$	17	10^5

* к (мф) - кислотным буфером на мембране; к - кислотным буфером; т - температурой



L.pneumophila 1 ATCC 33152 (5 сут; GVPC)

вания в прямом посеве по сравнению с эталонной культурой *L.pneumophila* (таблица 3).

Выводы

Суммируя вышеизложенное, можно сказать, что эффективность культурального метода выделения легионелл зависит от чувствительности и селективности используемой методики, уровней контаминации посторонней микрофлорой, видового состава биоценоза исследуемого объекта, а также соотношения концентрации легионелл и фоновой флоры в пробе.

Более высокая чувствительность метода [2], основанного на прямом посеве МФ, по сравнению с [4] обусловлена:

- отсутствием потерь целевых микроорганизмов на этапах отмывки МФ и центрифугирования;

- снижением ингибирующей активности питательной среды за счет введения в систему микроорганизм - питательная среда мембранного фильтра;

- отмывкой сконцентрированной на МФ пробы от кислоты после селективной деконтаминации.

Метод [2] также является более простым и быстрым в исполнении, позволяет исследовать большой диапазон объемов исследуемого материала и требует меньшего расхода питательных сред.

Однако, несмотря на определенные преимущества каждой из методик, ни одна из них не является универсальной.

Существуют ситуации, при которых стандартные методики из-за недостаточной селективности не позво-

ляют выявить наличие и оценить степень контаминации объекта легионеллами.

Отсутствие технической возможности определения легионелл в объекте требует использования других методов контроля, например, таких как ПЦР в режиме реального времени, о высокой корреляции которого с культуральным методом сообщается в [8].

Кроме того, как вспомогательный показатель можно использовать ОМЧ 30°C, предлагаемый [3]. Очевидно, что объект - источник аэрозоля, содержащий высокие уровни бактериальной флоры, даже при отсутствии доказательств наличия в нем легионелл является эпидемически неблагоприятным.

Заключение

Полученные результаты свидетельствуют о значительной контаминации легионеллами различных искусственных водных объектов, включая питаемые централизованным водоснабжением устройства, что делает крайне важной задачу постоянного мониторинга концентрации легионелл в воде этих объектов. В связи с этим, по нашему мнению, отечественную нормативно-методическую базу крайне желательно дополнить методом исследования на основе [2], предусматривающим прямой посев пробы методом мембранной фильтрации.

Выбор методики исследования должен определяться типом исследуемых вод и предполагаемыми уровнями контаминации. При исследовании технических вод предприятий оптимальной и целесообразной является

комбинация двух методов. При высоких уровнях контаминации фоновой флорой в качестве вспомогательного показателя целесообразно, на наш взгляд, использовать показатель ОМЧ 30°C. Высокие уровни контаминации объекта посторонней флорой являются показанием для параллельного применения альтернативных методов исследования.

Сергей Тымчук,
ведущий бактериолог,
кандидат медицинских наук;
Владимир Ларин,
начальник отдела биологических
методов анализа, кандидат
биологических наук;
Екатерина Спиридонова,
бактериолог 2 категории;
Алексей Дородников,
бактериолог 1 категории,
кандидат медицинских наук;
Зоя Погосян,
бактериолог 2 категории;
Елена Ахапкина,
начальник сектора
бактериологии и вирусологии.
ЗАО «РОСА» (г. Москва)

Литература

1. ISO 11731:1998 «Water quality - Detection and enumeration of Legionella».
2. ISO 11731-2:2004 «Water quality - Detection and enumeration of Legionella - Part 2: Direct membrane filtration for waters with low bacterial count».
3. The European Guidelines for Control and Prevention of Travel Associated Legionnaires' Disease, 2005 (http://www.ewgli.org/data/european_guidelines.htm).
4. Выявление бактерий *Legionella pneumophila* в объектах окружающей среды: Методические указания. - М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2007. - 27 с.
5. Организация внутреннего контроля качества санитарно-микробиологических исследований воды: Методические указания - М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2001. - 62 с.
6. Профилактика легионеллеза: Санитарно-эпидемиологические правила. - М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010. - 26 с.
7. Дронина Ю. Е. [и др.] / Серологическая характеристика штаммов *Legionella pneumophila*, выделенных из потенциально опасных водных систем в Российской Федерации в 2007-2011 годах // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. - 2012. - № 2. - С. 23-28.
8. Тартаковский И. С. [и др.] / Частота и уровень контаминации *Legionella pneumophila* потенциально опасных водных объектов в Московском регионе // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. - 2010. - № 6. - С. 21-26.
9. Тымчук С.Н., Ларин В.Е. / Сравнительная характеристика методов выделения легионелл в воде согласно ИСО 11731:1998, ИСО 11731-2:2004 и МУК 4.2.2217-07 // Материалы конгресса «Вода: экология и технология» «Экватэк-2008», Москва, 2008.