

Применение ПЦР для диагностики легионеллезной инфекции у гематологических больных

С. Б. Яцышина¹, Т. И. Карпова², О. В. Мариненко²,
Ю. Е. Дронина², Г. М. Галстян³, И. С. Тартаковский²

¹ЦНИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия

²ФГБУ «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия

³ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России, Москва, Россия

Цель. Оценить эффективность применения ПЦР для диагностики легионеллезной пневмонии в жидкости бронхоальвеолярного лаважа (ЖБАЛ) у гематологических больных с острой дыхательной недостаточностью.

Материал и методы. Методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) исследовали 79 образцов ЖБАЛ, полученных у гематологических больных с пневмониями и острой дыхательной недостаточностью, которые находились на лечении в 2011–2014 гг. Все образцы ЖБАЛ были исследованы на легионеллез бактериологическим методом сразу же после получения и хранились при -70°C . ДНК *Legionella pneumophila* обнаруживали методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени с использованием набора реагентов производства ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора.

Результаты. Из 79 исследованных образцов ЖБАЛ в 7 случаях ранее диагноз был подтвержден выделением культуры легионелл. В 3 случаях была выделена культура *L. pneumophila* серогруппы 1 (ST 42,36,1489) и в 4 — *L. pneumophila* серогруппы 3 (все изоляты принадлежали к ST 87). Результаты ПЦР-исследования данных образцов совпали с результатами бактериологического метода.

Выводы. ПЦР может быть использована для диагностики легионеллеза в ЖБАЛ. Метод отличается высокой чувствительностью. По сравнению с бактериологическим методом ПЦР дает возможность на 3–4 суток ускорить диагностику легионеллезной пневмонии.

Ключевые слова: *Legionella*, ПЦР, гематологические больные, пневмония.

Use of PCR for Diagnosis of *Legionella* Infection in Hematological Patients

S. B. Yatzyshina¹, T. I. Karpova², O. V. Marinenko², Yu. E. Dronina², G. M. Galstyan³, I. S. Tartakovskiy²

¹ Central Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

² Federal Research Center of Epidemiology and Microbiology named after N.F. Gamaleya, Moscow, Russia

³ Hematological Scientific Center, Moscow, Russia

Objective. To assess efficacy of PCR for detection of *Legionella* in bronchoalveolar lavage (BAL) fluid obtained from hematological patients with pneumonia and acute respiratory failure.

Material and Methods. A total of 79 BAL samples collected from the hospitalized hematological patients with pneumonia and acute respiratory failure (during the 2011–2014) were analyzed using PCR. All BAL samples have been tested for legionellosis by culture immediately after collection, and then stored at -70°C . *Legionella pneumophila* DNA was detected using real-time PCR.

Results. Of 79 BAL samples tested, legionellosis have previously been confirmed by culture in 7 cases:

Контактный адрес:

Игорь Семенович Тартаковский

Эл. почта: itartak@list.ru

3 patients had *L. pneumophila* serogroup 1 (ST42, 36, 1489) and 4 patients had serogroup 3 (ST87). Results of PCR assay on these samples coincided with the results of culture method.

Conclusions. PCR may be used for detection of *Legionella* in BAL fluid and has a high sensitivity.

Введение

Наиболее распространенным методом диагностики легионеллезной инфекции является тест на обнаружение в моче растворимого антигена *Legionella pneumophila* серогруппы 1, поскольку 90% случаев легионеллезов приходится на возбудитель, относящийся к этой серогруппе [1, 2]. Этот тест прост в постановке, выполняется быстро, обладает высокой чувствительностью. Исследование проводится *иммуноферментным методом* (ИФА) или методом *иммунохроматографии* (ИХА), последний рекомендован для скрининга и требует подтверждения. В странах Европы 79% диагностических исследований на легионеллез проводятся именно этими методами [3]. Однако у иммунокомпromетированных больных серьёзную опасность могут представлять также *L. pneumophila* других серогрупп [4]. Помимо этого, исследование недоступно у больных с олигоанурией.

В подобных случаях наиболее приемлемым решением может служить использование *полимеразной цепной реакции* (ПЦР). Для диагностики легионеллезной инфекции в Европе ПЦР не является ведущим тестом, однако его доля за последние 5 лет увеличилась с 2 до 6%, при этом в некоторых странах, таких как Дания и Швеция, метод ПЦР используется более чем в 25% диагностических исследований на легионеллез [3].

С середины 1990-х годов для диагностики легионеллеза активно разрабатываются и используются различные модификации ПЦР. Среди геномишей чаще всего используют гены рибосомальной РНК; ген, кодирующий белок теплового шока (*dnaJ*); ген РНК-полимеразы (*rpoB*); ген, определяющий способность к инфекции макрофагов (*tip*) [5–7]. В последние годы для диагностики легионеллеза используются видоспецифическая для *L. pneumophila* тест-система на основе гена *tip* и родоспецифическая — на основе 16S рибосомальной РНК. Несмотря на большой практический опыт использования ПЦР, разработку количественных модификаций ПЦР в реальном времени, до настоящего времени ПЦР диагностика не включена в качестве основного метода в стандарты диагностики легионеллеза. Вместе с тем в ряде известных референс-лабораторий, специализирующихся

Compared to culture, PCR allows to get results earlier by 3–4 days and thus, to make diagnosis of *Legionella pneumoniae* faster.

Key words: *Legionella*, PCR, hematological patients, pneumonia.

на диагностике легионеллеза (Дрезден, Германия; Копенгаген, Дания), метод ПЦР применяют с высокой степенью эффективности на протяжении многих лет в комплексе с другими хорошо стандартизованными методами диагностики легионеллеза [6, 8].

В Российской Федерации за последние годы накоплен положительный опыт лабораторной диагностики легионеллезной инфекции с использованием бактериологического и иммунохроматографического методов [9–12]. Наиболее показательны результаты анализа частоты выявления и особенностей течения легионеллезной инфекции у гематологических больных. Диагноз легионеллезной пневмонии был подтвержден у более чем 10% пациентов отделения реанимации и интенсивной терапии Гематологического научного центра, поступивших в связи с развитием острой дыхательной недостаточности [4, 13]. Вместе с тем наряду с надежностью и эффективностью применявшегося алгоритма лабораторной диагностики легионеллеза стали очевидны и его недостатки для иммунокомпromетированных больных. Экспресс-диагностика легионеллеза, основанная на определении легионеллезного антигена в моче иммуноферментным или иммунохроматографическим методом, была невозможна у пациентов с острой или хронической почечной недостаточностью, которым проводился гемодиализ. Выделение культуры *L. pneumophila* из *жидкости бронхоальвеолярного лаважжа* (ЖБАЛ) бактериологическим методом занимало не менее 4–5 суток, вследствие этого нередко диагноз легионеллеза устанавливался слишком поздно и этиотропную терапию не успевали назначить.

В связи с изложенными обстоятельствами вопрос применения ПЦР для быстрой диагностики легионеллезной инфекции у данной категории больных представляется весьма актуальным.

Цель настоящей работы — оценить эффективность применения ПЦР для диагностики легионеллезной пневмонии в ЖБАЛ у гематологических больных с острой дыхательной недостаточностью.

Материал и методы

В работе использовали 79 образцов ЖБАЛ, полученных у гематологических больных с пнев-

Результаты выявления ДНК *L. pneumophila* в жидкости БАЛ у гематологических больных с острой дыхательной недостаточностью

Возраст пациента, лет	Пол	Гематологический диагноз	Характеристика выделенной культуры <i>L. pneumophila</i>	Результаты ПЦР	
				<i>L. pneumophila</i> , значение порогового цикла	ДНК человека, значение порогового цикла
83	м	Неходжкинская лимфома	Серогруппа 3, ST87	27,62	26,93
64	м	Множественная миелома	Серогруппа 3, ST87	27,08	27,43
58	м	Лекарственный агранулоцитоз	Серогруппа 1, St42	12,80	15,15
83	м	Неходжкинская лимфома	Серогруппа 1, ST36	17,41	18,1
32	м	Острый лимфобластный лейкоз	Серогруппа 3, ST87	13,50	20,08
55	м	Множественная миелома	Серогруппа 1, ST1489	10,68	20,05
34	м	Иммунная тромбоцитопения	Серогруппа 3, ST87	12,2	13,36

мониями и острой дыхательной недостаточностью, которые находились на лечении в 2011–2014 гг. Бронхоскопию для получения ЖБАЛ проводили в соответствии с методикой, описанной ранее [14]. Объем полученной ЖБАЛ варьировал от 100 до 80 мл. Все образцы ЖБАЛ были исследованы на легионеллез бактериологическим методом в НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи с целью выделения культуры легионелл согласно стандартному протоколу [4]. Оставшиеся аликвоты образцов ЖБАЛ хранились при -70°C до выполнения ПЦР.

ПЦР проводили в референс-центре по мониторингу за возбудителями инфекций верхних и нижних дыхательных путей ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора с использованием набора реагентов [15] производства ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора на приборе RotorGene 6000 («Corbett Research», Австралия). Мишенью для обнаружения ДНК *L. pneumophila* в данном тесте является ген *tip*, кодирующий протеин, являющийся фактором вирулентности, необходимым для внутриклеточной инвазии в макрофаги, присутствующий в геноме *L. pneumophila* всех серогрупп. Метод выявления ДНК *L. pneumophila* в клиническом материале основан на одновременной амплификации участка ДНК гена *tip* *L. pneumophila* и участка генома человека (эндогенный внутренний контроль). Результат амплификации ДНК *L. pneumophila* регистрируется при измерении флуоресценции красителя JOE, результат амплификации ДНК внутреннего контроля регистрируется при измерении флуоресценции красителя FAM.

Эндогенный внутренний контроль позволяет не только контролировать этапы ПЦР-анализа (экстракцию ДНК и проведение ПЦР), но и оценивать адекватность забора материала, что необходимо, так как искомым возбудителем является внутриклеточным патогеном.

Образцы ЖБАЛ в количестве 1 мл центрифугировали на настольной центрифуге в пробирках вместимостью 1,5 мл при 10 тыс. об/мин в течение 10 мин. Надосадочную жидкость отбирали, и осадок ресуспендировали в 100 мкл оставшейся жидкости. Полученную суспензию (50 мкл) использовали для экстракции ДНК без добавления экзогенного внутреннего контрольного образца.

Результаты исследования

Результаты исследований положительных в ПЦР образцов представлены в таблице. ДНК *L. pneumophila* была обнаружена в 7 (8,9%) из 79 исследованных образцов ЖБАЛ. Из этих же образцов ранее была выделена культура легионелл: в 3 случаях — культура *L. pneumophila* серогруппы 1 (ST 42,36,1489) и в 4 случаях — *L. pneumophila* серогруппы 3 (все изоляты принадлежали к ST 87). При отрицательных результатах бактериологического исследования ЖБАЛ ДНК *L. pneumophila* была обнаружена в одном образце. Длительное хранение образцов БАЛ при -70°C (от 8 мес. до 3 лет) не оказало влияния на выявление в них ДНК *L. pneumophila* в бактериологически подтвержденных случаях заболевания.

Следует отметить, что при получении ЖБАЛ по стандартной методике клинический материал

сильно разводится вследствие введения большого объема 0,9% раствора натрия хлорида (160 мл) в бронхиальное дерево. При этом в ряде образцов ЖБАЛ количество клеток человека (геномной ДНК человека, определяемой в тесте) может быть ниже рекомендованного инструкцией к набору реагентов, что будет выражаться в отсутствии либо в позднем появлении (значение порогового цикла более 28) сигнала амплификации эндогенного внутреннего контроля и потребует повторной экстракции ДНК с целью предотвращения ложноотрицательных результатов исследования. В таких случаях на этапе предварительной подготовки материала к ПЦР-исследованию необходимо повторно центрифугировать ЖБАЛ для концентрирования клеток человека таким образом, чтобы экстракция ДНК проводилась из осадка 5–10 мл образца ЖБАЛ.

Обсуждение результатов

В последние годы количественные модификации ПЦР широко и эффективно применяются в Российской Федерации для профилактического мониторинга легионелл в потенциально опасных водных системах [16, 17]. Для диагностики легионеллеза у пациентов применение ПЦР в нашей стране ограничено несколькими скрининговыми исследованиями по анализу этиологической структуры пневмоний [18, 19]. Анализ достоверности полученных результатов ПЦР в данных исследованиях затруднен отсутствием стандартных тестов для окончательного подтверждения диагноза легионеллезной инфекции (выделение культуры, определение антигена легионелл в моче, нарастание титров антител в реакции иммунофлуоресценции), за исключением расследования эпидемической вспышки легионеллеза в Верхней Пышме, когда одновременно диагноз был подтвержден иммунохроматографическим методом и ПЦР, причем для ПЦР в данном исследовании был доступен лишь секционный материал [20].

Очень важным аспектом эффективного применения ПЦР для диагностики легионеллеза является и фактор адекватности биологического материала, используемого для исследования. Наиболее надежно исследование ЖБАЛ или материала биопсии. Анализ самостоятельно откашливаемой пациентом мокроты или крови пациентов, используемый для ПЦР-диагностики пневмоний другой этиологии, не является адекватным методическим подходом для диагностики легионеллеза, поскольку возбудитель, являясь внутриклеточным патогеном, локализован в резидентных макрофагах легких; кроме того, продуктивный кашель наблюдается только у половины больных легионеллезной инфек-

цией [21]. В ряде случаев альтернативой может быть получение мокроты после ингаляции гипертонического раствора хлорида натрия, поскольку такая процедура индуцирует образование и отхождение мокроты у пациента [22]. Использование индуцированной мокроты позволяет повысить на 36% выявляемость легионелл методом ПЦР по сравнению с исследованием обычной мокроты [23].

В данном исследовании впервые в России удалось оценить эффективность ПЦР-диагностики для группы гематологических больных с бактериологически доказанным диагнозом легионеллезной инфекции.

Полученные результаты подтверждают важное значение ПЦР-диагностики легионеллеза у иммунокомпрометированных пациентов с острой дыхательной недостаточностью. Выигрыш во времени 3–4 суток, по сравнению с бактериологическим анализом ЖБАЛ, может быть определяющим для успешной антибиотикотерапии и исхода болезни. В то же время в 1 из 79 образцов получен результат, который можно трактовать как ложноположительный, что указывает на необходимость бактериологического подтверждения ПЦР-диагностики легионеллеза.

Необходимо отметить, что в этиологии внебольничных легионеллезных пневмоний основная роль принадлежит *L. pneumophila* серогруппы 1. В этом случае методом выбора является иммунохроматографический метод определения антигена легионелл в моче и по срокам исследования (30 мин), и по доступности биологического материала. Но при легочных осложнениях у иммунокомпрометированных больных высока вероятность этиологической роли штаммов других серогрупп *L. pneumophila*, антиген которых не выявляется столь надежно иммунохроматографическим методом в моче больных. В наших исследованиях у 4 больных инфекция была обусловлена штаммом *L. pneumophila* серогруппы 3 [4]. Поэтому альтернативы ускоренной диагностике легионеллеза с использованием ПЦР жидкости БАЛ для данной категории больных нет. Для иммунокомпрометированных больных этиологическое значение оппортунистических видов легионелл (*L. longbeachae*, *L. dumofii*, *L. bozemanii*, *L. micdadei*) и серотипов легионелл, отличных от серогруппы 1, достаточно велико. Поэтому в дальнейшем представляется перспективной разработка и применение триплексной модификации ПЦР для диагностики легионеллеза, позволяющей не только быстро подтвердить диагноз легионеллезной инфекции, но одновременно установить серотипическую и видовую принадлежность *Legionella* spp. [3, 24].

Литература

1. European guidelines for control and prevention of travel-associated legionellosis. London, 2002.
2. П 3.1.2.2626-10. Профилактика легионеллеза. Москва, 2010.
3. С. Legionnaires' disease in Europe, 2012. Stockholm: ECDC; 2014.; www.ecdc.europa.eu.
4. Тартаковский И. С., Адгамов Р. Р., Ермолаева С. А. и соавт. Методические особенности диагностики легионеллезной пневмонии в лечебно-профилактических учреждениях. Часть 2. Клинико-микробиол антимикроб химиотер 2013; 15(3):166-17.
5. Lisby G., Dessau R. Construction of a DNA amplification assay for detection of *Legionella* species in clinical samples. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1994; 13:225-31.
6. Uldum S., Molbak K. PCR as a routine method for diagnosis of Legionnaires' Disease. In: "Legionella" ASM Press Washington, ed. Marre R. et al. 2002:213-5.
7. Haiden R., Uhl J., Qian X., et al. Direct detection of *Legionella* species from bronchoalveolar Lavage and open lung biopsy specimens: comparison of light cyclers PCR, in situ hybridization, direct fluorescence antigen detection and culture. J Clin Microbiol 2001; 39 (7):2618-26.
8. Lueck P. C., Eiker C., Reischl U., et al. Culture independent identification of the source of an infection by direct amplification and sequencing of *L. pneumophila* DNA from a clinical specimen. J Clin Microbiol 2007; 45(9):3143-4.
9. Тартаковский И. С., Гинцбург А. Л., Михайлова Д. О. и соавт. Применение стандартов лабораторной диагностики легионеллеза во время эпидемической вспышки пневмоний в городе Верхняя Пышма Свердловской области. Клинико-микробиол антимикроб химиотер 2007; 9(4):361-8.
10. Кадышев В. А., Чернобровкина Т. Я., Томилин Ю. Н. и соавт. Случай легионеллеза из практики. Материалы российской научно-практической конференции «Актуальные вопросы инфекционной патологии» Томск 2009:84-6.
11. Соколова Л. В., Литвинова О. С., Кадышев В. А., Козлова В. С.. Случай легионеллеза из практики. Тезисы докладов IX научно-практической конференции «Инфекционные болезни и антимикробные средства» Москва, октябрь 2011:79-80.
12. Бобылева З. Д., Лещенко И. В. Клинико-лабораторная характеристика легионеллезной пневмонии (по материалам эпидемической вспышки легионеллеза в Свердловской области). Клинико-микробиол антимикроб химиотер 2010; 12(2):117-26.
13. Галстян Г. М., Костина И. Э., Катрыш С. А. и соавт. Клинические проявления легионеллезной пневмонии у гематологических больных. Тер архив 2014; 86(3):45-52.
14. Соколов А. Н., Галстян Г. М., Савченко В. Г. Респираторные проявления внегочечных заболеваний. Гематологические заболевания. В кн: Респираторная медицина. Под ред А. Г. Чучалина. М. 2007 г., ГЭОТАР-Медиа, Т. 2:605-19.
15. Яцышина С. Б., Портенко С. А., Астахова Т. С. и соавт. Разработка и применение ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией для обнаружения *Legionella pneumophila* ЖМЭИ 2008; (2):29-37.
16. Садретдинова О. В., Груздева О. А., Карпова Т. И. и соавт. Контаминация *Legionella pneumophila* систем горячего водоснабжения зданий общественного назначения, в том числе лечебно-профилактических учреждений. Клинико-микробиол антимикроб химиотер 2011; 2:163-7.
17. Тартаковский И. С., Груздева О. А., Галстян Г. М., Карпова Т. И. Профилактика, диагностика и лечение легионеллеза. Москва, Студия МДВ, 2013.
18. Рачина С. А., Козлов Р. С., Шаль Е. П. и соавт. Структура бактериальных возбудителей внебольничной пневмонии в многопрофильных стационарах Смоленска. Пульмонология 2011; (1):5-18.
19. Шкарин В. В., Чубукова О. А., Ковалишена О. В., Благодирова А. С. Оценка эпидемиологической ситуации по легионеллезу в Нижегородской области. Мед альманах 2012; (3):55-60.
20. Яцышина С. Б., Астахова Т. С., Романенко В. В. и соавт. Применение молекулярно-генетических методов при исследовании вспышки болезни легионеров в г. Верхняя Пышма. Журн микробиол 2008; (2):23-8.
21. Murdoch D. R. Diagnosis of *Legionella* infection. Clin Infect Dis 2003; 36:64-9.
22. К 4.2.3115-13. Лабораторная диагностика внебольничных пневмоний. Москва, 2014.
23. Maze M. J., Slow S., Cumins A. M., et al. Enhanced detection of Legionnaires' disease by PCR testing of induced sputum and throat swabs. Eur Respir J 2014; 43(2):644-66.
24. Kerdsin A., Uchida R., Verathamjamrus C., et al. Development of Triplex SYBR Green Real-Time PCR for detecting *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamidophila pneumoniae* and *Legionella* spp. without extraction of DNA. Jpn J Infect Dis 2010; 63:173-80.